

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Producción Animal**



**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN  
RAZAS EQUINA AUTÓCTONAS ESPAÑOLAS  
DETECTADA MEDIANTE MICROSATÉLITES**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

**María Luisa Checa Cortés**

**Bajo la dirección de los Doctores:**

**Susana Dunner  
Miguel Vallejo Vicente**

**Madrid, 2004**

**ISBN: 84-669-2673-9**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA



*Análisis de la Variabilidad Genética en  
Razas Equinas Autóctonas Españolas  
detectada mediante microsatélites*

Tesis Doctoral

María Luisa Checa Cortés  
Madrid, 2004

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
***Facultad de Veterinaria***

***Análisis de la Variabilidad Genética en  
Razas Equinas Autóctonas Españolas  
detectada mediante microsatélites***

*Memoria presentada por María Luisa Checa Cortés para optar al grado de  
Doctor, realizada en el Departamento de Producción Animal de la Facultad  
de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y codirigida por  
la Dra. Susana Dunner y por el Dr. Miguel Vallejo*

# **1. ÍNDICE DE CONTENIDOS**



1. ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	1
2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	5
3. ABREVIATURAS .....	13
I. RESUMEN-ABSTRACT .....	14
II. INTRODUCCIÓN.....	16
II.1. Concepto de raza.....	16
II.2. Biodiversidad.....	18
II.3. Sistemática y filogenia del caballo.....	21
II.4. Aspectos genéticos de la domesticación. El origen de las razas .....	23
II.5. Origen y Evolución histórica de las razas incluidas en el estudio.....	25
II.6. Descripción morfológica de las razas autóctonas incluidas en el estudio.....	27
II.6.1. Raza Asturcón.....	27
II.6.2. Raza Jaca Navarra .....	29
II.6.3. Raza Caballo de Pura Raza Gallega.....	31
II.6.4. Raza Pottoka.....	33
II.6.5. Raza Losina.....	34
II.6.6. Raza Mallorquina .....	36
II.6.7. Raza Menorquina .....	37
II.7. Otras razas europeas de caballos de pequeña alzada de origen celta.....	39
II.7.1. Raza Exmoor .....	39
II.7.2. Raza Dartmoor.....	39
II.7.3. Poni Welsh.....	40
II.7.4. Raza Highland .....	41
II.7.5. Raza Connemara.....	41
II.7.6. Raza Shetland.....	42
II.7.7. Raza Gotland.....	42
II.7.8. Raza Islandes.....	43
II.7.9. Raza Landais .....	43
II.8. Diversidad genética .....	44
II.8.1. Marcadores genéticos.....	45
II.8.1.a. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms o Fragmentos de Restricción de Longitud Variable) .....	46
II.8.1.b. RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA o Polimorfismos de ADN amplificados de forma aleatoria) .....	47
II.8.1.c. AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) .....	47
II.8.1.d. VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) .....	

I.8.1.d.1. Minisatélites .....	48
II.8.1.d.2. Microsatélites.....	49
II.8.1.d.2.1. Localización de los microsatélites a lo largo del genoma.....	50
II.8.1.d.2.2. Importancia funcional de los microsatélites.....	51
II.8.1.d.2.3. Razones que justifican el uso de los microsatélites como marcador ideal para el análisis genético de poblaciones.....	54
II.8.1.d.2.4. Aplicaciones de los microsatélites .....	55
II.8.1.d.2.5. Automatización del genotipado con microsatélites .....	60
II.8.1.d.2.6. Modelización del proceso mutacional en microsatélites .....	66
II.8.1.d.2.7. Factores que afectan a los procesos mutacionales en microsatélites .....	68
II.8.1.d.2.8. Problemas laboratoriales potenciales de los microsatélites. ....	69
II.8.1.e. Marcadores en el ADN mitocondrial.....	71
II.8.1.f. Cromosoma Y.....	71
II.8.1.g. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs).....	72
II.8.1.h. Secuenciación .....	74
II.8.2. Mecanismos evolutivos que actúan sobre las poblaciones naturales. ....	74
II.8.2.a. Procesos sistemáticos.....	75
II.8.2.a.1. Migración.....	75
II.8.2.a.2. Mutación.....	75
II.8.2.a.3. Selección. ....	76
II.8.2.b. Procesos dispersivos.....	77
II.8.2.b.1. Deriva genética.....	77
II.8.3. Los cuellos de botella en las poblaciones.....	77
II.8.4. Los estadísticos F de Wright como medidores de la variabilidad genética .....	78
II.8.5. Distancias genéticas. ....	80
II.8.5.a. Estimadores de distancias genéticas basados en el modelo IAM.....	80
II.8.5.b. Estimadores de distancias genéticas basados en el modelo SSM. ....	82

II.8.5.c. Estimadores de distancias genéticas no basados en ningún modelo mutacional.....	83
II.8.6. Árboles filogenéticos.....	84
II.8.7. Análisis de correspondencia.....	86
II.8.8 Asignación racial.....	86
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>88</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>89</b>
IV.1. Muestreo de las razas incluidas en el estudio.....	89
IV.2. Metodología laboratorial para el genotipado de los animales.....	91
IV.2.1. Extracción de ADN a partir de las muestras biológicas individuales.....	91
IV.2.2. Selección de los marcadores genéticos empleados para el genotipado.....	93
IV.2.2.a. Amplificación por PCR de los microsatélites seleccionados.....	94
IV.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida del producto amplificado.....	96
IV.2.4. Genotipado de los animales.....	98
IV.3. Análisis estadístico de los resultados.....	98
IV.3.1. Estimación de parámetros indicativos de la variabilidad genética dentro de poblaciones.....	98
IV.3.1.a. Cálculo de las frecuencias alélicas.....	98
IV.3.1.b. Heterocigosis.....	99
IV.3.1.c. Equilibrio Hardy-Weinberg.....	100
IV.3.1.d. Estimación de un episodio reciente de cuello de botella.....	101
IV.3.2. Estimación de la diferenciación genética entre poblaciones.....	102
IV.3.2.a. Cálculo de los estadístico F de Wright.....	102
IV.3.2.b. Cálculo del coeficiente de diferenciación génica ( $G_{ST}$ ).....	102
IV.3.2.c. Análisis filogenético.....	102
IV.3.2.c.1. Estima de distancias genéticas entre poblaciones.....	102
IV.3.2.c.2. Construcción de árboles filogenéticos.....	103
IV.3.2.d. Medidas de similitud entre individuos.....	104
IV.3.2.e. Análisis de Correspondencia.....	105
IV.3.2.f. Asignación racial.....	105
IV.3.2.f.1. Métodos basados en frecuencias.....	105
IV.3.2.f.2. Métodos Bayesianos.....	105

IV.3.2.f.3. Métodos basados en distancias genéticas. ....	106
<b>V. RESULTADOS</b> .....	107
V.1. Patrones de amplificación de los microsatélites.....	107
V.2. Estimación de parámetros indicativos de la variabilidad genética dentro de poblaciones. ....	110
V.2.1. Cálculo de las frecuencias alélicas. ....	112
V.2.2. Heterocigosis.....	127
V.2.3. Equilibrio Hardy-Weinberg.....	129
V.3. Estimación de un episodio reciente de cuello de botella. ....	130
V.4. Análisis de la diferenciación genética entre poblaciones.....	131
V.4.1. Test de diferenciación génica por pares de poblaciones y sobre el total de las razas. ....	131
V.4.2. Cálculo de los estadístico F de Wright y del coeficiente de diferenciación genética ( $G_{ST}$ ) .....	132
V.5. Análisis filogenético. ....	134
V.5.1. Estima de distancias genéticas entre poblaciones. ....	134
V.5.2. Construcción de árboles filogenéticos.....	136
V.6. Medidas de similitud entre individuos. ....	137
V.7. Análisis de Correspondencia. ....	139
V.8. Asignación racial.....	146
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	152
VI.1. Variabilidad genética dentro de razas.....	154
VI.1.1. Heterocigosis .....	157
VI.1.2. Equilibrio Hardy-Weinberg .....	160
VI.2. Análisis de cuello de botella .....	162
VI.3. Variabilidad genética entre razas.....	164
VI.4. Distancias genéticas entre razas y su representación gráfica.....	166
VI.5. Asignación racial. ....	172
VI.6. Implicaciones para la conservación de la diversidad genética.....	175
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	179
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	180
<b>IX. ANEXOS</b> .....	208

## **2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

## II. INTRODUCCIÓN

<b>Figura 2.1.:</b> Representación esquemática de la filogenia del género <i>Equus</i> .....	23
<b>Figura 2.2.:</b> Raza Asturcón .....	28
<b>Figura 2.3.:</b> Jaca Navarra .....	30
<b>Figura 2.4.:</b> Zona geográfica de influencia histórica de la Jaca Navarra (trama rayas oblicuas) y reducto actual en el que se ubica (sombreado rojo) .....	30
<b>Figura 2.5.:</b> Caballo de Pura Raza Gallega.....	32
<b>Figura 2.6.:</b> Raza Pottoka.....	34
<b>Figura 2.7.:</b> Raza Losina.....	35
<b>Figura 2.8.:</b> Raza Mallorquina .....	37
<b>Figura 2.9.:</b> Raza Menorquina .....	38
<b>Figura 2.10.:</b> Raza Exmoor .....	39
<b>Figura 2.11.:</b> Raza Dartmoor .....	40
<b>Figura 2.12.:</b> Raza Welsh .....	40
<b>Figura 2.13.:</b> Raza Highland .....	41
<b>Figura 2.14.:</b> Raza Connemara.....	41
<b>Figura 2.15.:</b> Raza Shetland.....	42
<b>Figura 2.16.:</b> Raza Gotland .....	42
<b>Figura 2.17.:</b> Raza Islandes.....	43
<b>Figura 2.18.:</b> Raza Landais .....	43
<b>Figura 2.19.:</b> Mapa con la distribución geográfica de las razas europeas de caballos de pequeña alzada de origen celta.....	44
<b>Figura 2.20.:</b> a) Representación esquemática de un sobrecruzamiento desigual de los cromosomas A y B, b) Fenómeno de deslizamiento de la polimerasa: generación y desaparición de una repetición por formación de un bucle en la hebra sintetizada de nuevo (cursiva) o en la hebra molde, respectivamente.....	49
<b>Figura 2.21.:</b> Estructura de las moléculas fluorescentes denominadas FAM, JOE, TAMRA y ROX, empleadas en el marcado de cebadores y dideoxinucleótidos.....	61
<b>Figura 2.22.:</b> Espectro de emisión de los fluorocromos 5-FAM, JOE, NED y ROX .....	62

<b>Figura 2.23.:</b> Representación esquemática de la óptica de trabajo de un secuenciador automático con una imagen de la pantalla en tiempo real representativa de la electroforesis en un gel de poliacrilamida .....	63
<b>Figura 2.24.:</b> Representación gráfica de la electroforesis en un secuenciador automático de un individuo con 7 microsatélites amplificados, cuyos alelos aparecen marcados en verde, negro y azul. Análisis realizado con el software GeneScan™ (AppliedBiosystems) .....	64
<b>Figura 2.25.:</b> Representación gráfica de la electroforesis de un individuo amplificado con siete microsatélites, cuyos resultados han sido analizados por medio del software Genotyper™ (AppliedBiosystems). En la imagen aparecen los picos de amplificación de cada microsatélite, asociados a unas etiquetas con el nombre del microsatélite y del alelo amplificado .....	64
<b>Figura 2.26.:</b> Representación esquemática de la metodología LASA .....	66
<b>Figura 2.27.:</b> Imagen obtenida con el software GeneScan™ (AppliedBiosystems) de la amplificación de un microsatélite en un individuo heterocigoto. En rojo aparece el tamaño en pares de bases de los alelos y en negro el tamaño de las <i>stutter bands</i> o bandas sombra de cada alelo, que son consecuencia de la amplificación de una, dos o tres repeticiones menos que el alelo verdadero .....	70
<b>Figura 2.28.:</b> Imagen obtenida con el software GeneScan™ (AppliedBiosystems) de la amplificación de un microsatélite en un individuo heterocigoto. En rojo aparece el tamaño en pares de bases de los alelos, en azul el tamaño de las <i>stutter bands</i> o bandas sombra de cada alelo, y en negro el tamaño de la banda sin la adición de la adenina .....	70

#### IV. MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Figura 4.1.:</b> Localización geográfica de las razas analizadas en este estudio .....	89
<b>Figura 4.2.:</b> Gel de agarosa al 0,8% en el que se han sometido a electroforesis en la calle 1: Marcador molecular de tamaño y en las calles 2 a 8 aproximadamente 2 µl del ADN genómico extraído y resuspendido.....	93
<b>Figura 4.3.:</b> Imagen de un gel de agarosa. Carreras 1-6, individuos amplificados para el microsatélite HTG8. M1 y M2, marcadores de tamaño .....	96
<b>Tabla 4.1.:</b> Raza, origen geográfico, censo actual de la población, y existencia y fecha de creación del Libro Genealógico .....	90

<b>Tabla 4.2.:</b> Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de sangre .....	91
<b>Tabla 4.3.:</b> Composición química de los tampones empleados en la extracción de ADN .....	92
<b>Tabla 4.4.:</b> Microsatélites empleados para el análisis de las razas estudiadas, referencias bibliográficas y cebadores empleados para su amplificación.....	94
<b>Tabla 4.5.:</b> Condiciones laborales empleadas para la amplificación de los microsatélites: temperatura de hibridación, concentración de cloruro de magnesio y número de ciclos de amplificación. Tamaño del producto amplificado.....	95
<b>Tabla 4.6.:</b> Concentración de los reactivos empleados en la elaboración de los geles de poliacrilamida.....	96
<b>Tabla 4.7.:</b> Composición del tampón de carga del producto amplificado en los geles de poliacrilamida.....	97
<b>Tabla 4.8.:</b> Protocolo de teñido con nitrato de plata de los geles de poliacrilamida .....	97

## V. RESULTADOS

<b>Figura 5.1.:</b> Imagen del patrón de amplificación del microsatélite HTG8.....	107
<b>Figura 5.2.:</b> Imagen del patrón de amplificación del microsatélite HMS2.....	107
<b>Figura 5.3.:</b> Imagen del patrón de amplificación del microsatélite AHT5.....	108
<b>Figura 5.4.:</b> Imágenes de los patrones de amplificación de los microsatélites HTG4, HTG7, HTG10 y HMS7 .....	108
<b>Figura 5.5.:</b> Imágenes de los patrones de amplificación de los microsatélites HTG6, HMS3, HMS6 y VHL20.....	109
<b>Figura 5.6.:</b> Imágenes de los patrones de amplificación de los microsatélites AHT4 y ASB2.....	109
<b>Figura 5.7.:</b> a) Número observado de alelos por raza para la totalidad de los microsatélites estudiados (valores mínimo y máximo) y número medio de alelos observados por raza, b) Número observado de alelos por microsatélite para todas las razas estudiados (valores mínimo y máximo) y número medio de alelos observados por microsatélite .....	111
<b>Figura 5.8.:</b> Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HTG4 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.....	113



<b>Figura 5.9.:</b> Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HTG6 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.....	114
<b>Figura 5.10.:</b> Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HTG7 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.....	115
<b>Figura 5.11.:</b> Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HTG8 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.....	116
<b>Figura 5.12.:</b> Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HTG10 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.....	117
<b>Figura 5.13.:</b> Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HMS2 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.....	118
<b>Figura 5.14.:</b> Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HMS3 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.....	119
<b>Figura 5.15.:</b> Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HMS6 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.....	120
<b>Figura 5.16.:</b> Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HMS7 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.....	121
<b>Figura 5.17.:</b> Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite ASB2 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.....	122
<b>Figura 5.18.:</b> Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite AHT4 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.....	123
<b>Figura 5.19.:</b> Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite AHT5 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.....	124

<b>Figura 5.20.:</b> Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite VHL20 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.....	125
<b>Figura 5.21.:</b> Frecuencias alélicas para el microsatélite HMS3 y HMS6 en el tronco atlántico (verde) y mediterráneo (azul) .....	126
<b>Figura 5.22.:</b> Distribución de las frecuencias alélicas de todos los microsatélites por categorías (0,00-0,10) (0,11-0,20) (0,21-0,30) (0,31-0,40) (0,41-0,50) (0,51-0,60) (0,61-0,70) (0,71-0,80) (0,81-0,90) (0,91-1,00) para cada raza analizada .....	130
<b>Figura 5.23.:</b> Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA a partir de la matriz de distancias genéticas $D_a$ .....	137
<b>Figura 5.24.:</b> Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA a partir de la matriz de distancias genéticas $F_{ST}$ .....	137
<b>Figura 5.25.:</b> Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA partiendo de la matriz de distancias genéticas de Bowcock entre pares de animales considerados como OTUs. Los 262 animales han sido seleccionados aleatoriamente (AST 67, JN 25, LOS 25, CG 50, PT 25, PSI 25, MEN 25 y MAL 20). .....	138
<b>Figura 5.26.:</b> Representación gráfica del análisis factorial de correspondencia de todas las razas considerando los factores 1 y 3.....	140
<b>Figura 5.27.:</b> Representación gráfica del análisis factorial de correspondencia de todas las razas considerando los factores 1 y 2.....	140
<b>Figura 5.28.:</b> Representación gráfica del análisis factorial de correspondencia de todas las razas considerando los factores 1, 2 y 3.....	141
<b>Figura 5.29.:</b> Representación gráfica del análisis factorial de correspondencia de todas las razas excepto Pura Sangre Inglés considerando los factores 1 y 2.....	143
<b>Figura 5.30.:</b> Representación gráfica del análisis factorial de correspondencia de todas las razas excepto Pura Sangre Inglés considerando los factores 1 y 3.....	143
<b>Figura 5.31.:</b> Representación gráfica del análisis factorial de correspondencia de todas las razas excepto Pura Sangre Inglés considerando los factores 1, 2 y 3.....	144
<b>Figura 5.32.:</b> Contribuciones totales (porcentaje) de cada microsatélite al primer factor, al segundo factor y al tercer factor .....	145
<b>Figura 5.33.:</b> Análisis de asignación racial mediante tres métodos: a) método de frecuencias, b) método Bayesiano, y c) método de distancia $D_a$ . Con barras	

verdes aparece el porcentaje de error tipo I (individuos asignados a una población incorrecta) y con barras rojas el porcentaje de error tipo II (raza a la que se adjudican individuos erróneos) .....	146
<b>Figura 5.34.:</b> Porcentaje de éxito en la asignación racial, por microsatélite (verde) y acumulada (rojo), utilizando el método Bayesiano.....	147
<b>Figura 5.35.:</b> Para cada raza en el eje $x$ se representan $(-\log\text{-verosimilitud})$ bajo la hipótesis de pertenencia a esa raza dada y en el eje $y$ se representan $(-\log\text{-verosimilitud})$ bajo la hipótesis de pertenencia al grupo del resto de razas. Los puntos verdes representan genotipos muestreados dentro de una raza y los puntos rojos representan genotipos muestreados dentro del grupo del resto de razas. ....	148
<b>Tabla 5.1.:</b> Número de alelos por microsatélite y por raza, número de alelos total por microsatélite y por raza, número medio de alelos por raza con su error estándar calculado sobre el tamaño de muestra total y muestra reducida y rango alélico en pares de bases por microsatélite sobre todas las razas. En rojo aparecen los valores más altos y en azul los más bajos .....	110
<b>Tabla 5.2.:</b> Alelos exclusivos de raza .....	112
<b>Tabla 5.3.:</b> Heterocigosis observadas ( $H_o$ ) y esperadas ( $H_e$ ) para cada raza por microsatélite. Heterocigosis totales con su desviación estándar (d.e.) por microsatélite y por raza. En rojo aparecen marcados los valores más altos de cada una de las heterocigosis por microsatélite y por raza, y en azul los valores más bajos. Recuadrados aparecen los valores de $H_o$ y $H_e$ donde las diferencias son mayores .....	128
<b>Tabla 5.4.:</b> Desviaciones con respecto al equilibrio Hardy -Weinberg de las razas analizadas, por microsatélite y total, calculadas con los métodos de cadenas de Markov y con un test $\chi^2$ -cuadrado siguiendo el método de Fisher (* significativo $P<0,05$ ; ** significativo $P<0,01$ ) .....	129
<b>Tabla 5.5.:</b> Pares de poblaciones que no muestran ser significativamente diferentes ( $P<0,01$ ) en el test de diferenciación génica de Fisher .....	131
<b>Tabla 5.6.:</b> Valores de $F_{IS}$ estimados por raza .....	132
<b>Tabla 5.7.:</b> Valores de $F_{IS}$ , $F_{ST}$ , $G_{ST}$ y $F_{IT}$ calculados por microsatélite y su valor total. En rojo aparecen los valores más altos y en azul los más bajos. (* $P<0,05$ , ** $P<0,01$ ).....	133
<b>Tabla 5.8.:</b> Matriz con las distancias genéticas $D_a$ estimadas por pares de poblaciones. En rojo aparecen los valores más altos y en azul los más bajos.....	134

<b>Tabla 5.9.:</b> Matriz con los valores $F_{ST}$ calculados por pares de poblaciones. En rojo aparecen los valores más altos y en azul los más bajos .....	135
<b>Tabla 5.10.:</b> Matriz de correlaciones de Pearson ( $r$ ) entre las matrices de distancias genéticas $F_{ST}$ obtenidas por microsatélite. En rojo aparece el valor más alto y en azul el más bajo, las celdas sombreadas muestran los valores negativos.....	136
<b>Tabla 5.11.:</b> Valores de inercia individual y acumulada de los cuatro factores principales cuando se analizan todas las poblaciones que forman parte del estudio.....	139
<b>Tabla 5.12.:</b> Valores de inercia aportados por cada raza.....	141
<b>Tabla 5.13:</b> Contribuciones de cada raza a la inercia total para los tres factores principales .....	142
<b>Tabla 5.14.:</b> Valores de inercia individual y acumulada de los cuatro principales factores cuando se analizan todas las poblaciones que forman parte del estudio excepto Pura Sangre Inglés .....	144
<b>Tabla 5.15.:</b> Contribuciones de cada raza, excepto Pura Sangre Inglés, a la inercia total para los tres factores principales. En rojo aparecen los valores más altos .....	144
<b>Tabla 5.16.:</b> Porcentajes de éxito en la asignación de muestras anónimas a su raza de origen, considerando parejas de razas, por medio del método Bayesiano con el procedimiento de asignación directa. En rojo se destacan los valores más altos y en azul los más bajos .....	148
<b>Tabla 5.17.:</b> Media de la (-log-verosimilitud) de los genotipos muestreados desde una raza bajo la hipótesis de que pertenezcan a esa misma raza (A), y bajo la hipótesis a alguna de las otras razas consideradas en el estudio (B). .....	149
<b>Tabla 5.18.:</b> Media de la (-log-verosimilitud) donde los genotipos se muestrean para cada raza dentro del grupo del resto de razas y se calcula la verosimilitud de que pertenezcan a esa raza (C) y que pertenezcan a cualquiera de las otras razas (D).. .....	150

## VI. DISCUSIÓN

**Figura 6.1.:** Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA partir de la matriz de distancias genéticas  $F_{ST}$ . Las cifras entre paréntesis al lado de cada raza representa el porcentaje de diversidad que se pierde por la

desaparición de esa población. Las cifras en los nodos representan el porcentaje de pérdida de diversidad por la desaparición de esos clusters por el procedimiento de Weitzman. ....	177
<b>Tabla 6.1.:</b> Estado actual de conocimiento del genoma equino según datos recogidos por el INRA (Institut National de la Recherche Agronomique).....	152
<b>Tabla 6.2.:</b> Número de alelos observados en las razas de caballos: Criollo Uruguayo, Noriker, Pura sangre Australiano y las razas autóctonas españolas (media de los valores individuales), y en una mezcla de razas de la especie <i>Equus asinus</i> (Andaluza, Catalana, Encartaciones, Mallorquina y Zamorano-Leonesa) .....	156
<b>Tabla 6.3.:</b> Valores por microsatélite del porcentaje de éxito de asignación racial, el número de alelos total observado, la heterocigosis esperada y el estadístico $F_{ST}$ .....	175
<b>Tabla 6.4.:</b> Valores de inercias (análisis de correspondencia) y diversidad (procedimiento de Weitzman) aportadas por cada una de las razas analizadas presentadas en el trabajo de García y col. (2000).....	177

### **3. ABREVIATURAS**

$\theta$ - fracción de recombinación	PSI - Pura Sangre Inglés
$\mu$ l - microlitro	PT - Pottoka
$\mu$ M - microMolar	QTL - Quantitative Trait Loci
A - Adenina	RAPDs - Random Amplified Polymorphism
a de C - antes de Cristo	DNA
ACPRA - Asociación de Criadores de Pura	RFLPs - Restriction Fragment Length
Raza Asturcón	Polymorphisms
ADN - Ácido Desoxirribonucleico	rpm - revoluciones por minuto
AFLPs - Amplified Fragment Length	SERGA - Sociedad Española para los
Polymorphisms	Recursos Genéticos Animales
ARN - Ácido Ribonucleico	SH - Size Homoplasmy
AST - Asturcón	SMM - Stepwise Mutation Model
C - Citosina	SNP - Single Nucleotide Polymorphism
CG - Caballo de Pura Raza Gallega	SSCP - Single Strand Conformation
cM - centiMorgan	Polymorphism
dNTP - desoxinucleotido	STR - Short Tandem Repeat
g - ges	T - Timina
G - Guanina	TPM - Two Phase Model
GSM - Generalized Stepwise Model	TTP - Tamaño Total de la Población
G <sub>ST</sub> - Coeficiente de diferenciación génica	U - unidades
He - Heterocigosis esperada	UPGMA - Unweighted Pair Group Method
Ho - Heterocigosis observada	Arithmetic
HPR - Hembras criadas en Raza Pura	VNTRs - Variable Number of Tandem
HR - Hembras Reproductoras	Repeats
H <sub>T</sub> - Heterocigosis total	vol - volumen
IAM - Infinite Allele Model	
INRA - Institute Nationale de la Recherche	
Agronomique	
ISAG - Internacional Society for Animal	
Genetics	
JN - Jaca Navarra	
KAM - K-allele Model	
Kb - Kilobase	
LASA - Ligate-assisted spacer addition	
log - logaritmo	
LOS - Losina	
M - Molar	
MAL - Mallorca	
MASH - Molecularly Accesible Size	
Homoplasmy	
Mb - Megabase	
MEN - Menorca	
mg - miligramos	
ml - mililitro	
mm - milímetros	
mM - miliMolar	
MR - Machos Reproductores	
ng - nanogramos	
NJ - Neighbour Joining	
NMA - Numero Medio de Alelos	
OTU - Operational Taxonomic Unit	
pb - pares de bases	
PCR - Polymerase Chain Reaction	
PRAM - Patronato de Razas Autóctonas de	
Mallorca	

## **I. RESUMEN-ABSTRACT**



En la actualidad existe una gran proporción de razas que se encuentran en peligro de extinción, cuyas perspectivas de futuro dependen del establecimiento de programas de conservación, que deben estar sustentados, entre otros, sobre estudios de diversidad genética.

Este trabajo estudia el estado genético de siete razas autóctonas de caballos españoles en peligro de extinción (Asturcón, Losina, Jaca Navarra, Pura raza de Caballo Gallego, Pottoka, Mallorquina y Menorquina) mediante la utilización de 13 microsatélites, ya que han demostrado ser la herramienta más adecuada para detectar la variabilidad genética entre razas estrechamente relacionadas. Estas siete razas fueron comparadas con una muestra poblacional de la Raza Pura Sangre Inglés.

Tomando como medidas de diversidad genética intrapoblacional la heterocigosis y la diversidad alélica, se observaron diferencias significativas entre las razas autóctonas para el número de alelos observados, pero no para la heterocigosis ( $P < 0,05$ ). Tan solo la Raza Mallorquina parece haber atravesado recientemente un cuello de botella, lo que está justificado por las diferencias encontradas entre la heterocigosis y la diversidad alélica. Los dendrogramas contruidos a partir de dos matrices de distancias,  $D_a$  y  $F_{ST}$ , con una correlación de  $r = 0,97$ , mostraron en ambos casos a las razas Mallorquina y Menorquina agrupadas en un clado distinto al resto de razas, estando más próximas a la Raza Pura Sangre Inglés. En el análisis de Correspondencia las razas Asturcón, Jaca Navarra y Losina, son las que contribuyen en mayor medida a la diversidad genética, para el primer, segundo y tercer factor, respectivamente.

De los tres métodos utilizados para asignar o excluir poblaciones como origen de individuos, el método Bayesiano fue el que mejores resultados aportó, estando la eficacia en la asignación correlacionada positivamente con el nivel de diferenciación genética existente entre las razas probables. Los microsatélites más eficaces en la asignación variaron con las razas involucradas, pero existe una correlación positiva entre el número de marcadores empleados y la eficacia en la asignación, aunque los costes de genotipado no compensan un empleo de más de diez a doce marcadores genéticos con este propósito

In the present time a great number of local breeds are threatened; their future depends on establishing conservation programs, which must be sustained on studies of genetic diversity beside other points.

This study corresponds to a first approach in the knowledge of the genetic variability of seven local Spanish horse breeds threatened (Asturcón, Losina, Jaca Navarra, Caballo de Pura Raza Gallega, Pottoka, Mallorquina and Menorquina). Thirteen microsatellites have been selected as molecular markers, since this kind of molecular marker has shown to be the most suitable tool to detect genetic variability among closely related breeds. These seven breeds were compared to a Thoroughbred population as outgroup.

Considering heterozygosity and allelic diversity as measures of genetic diversity, significant differences were detected between the local breeds for allelic diversity, but not significant for heterozygosity ( $P < 0,05$ ). Mallorquina breed has experienced a bottleneck recently, which justifies the difference between heterozygosity and allelic diversity. The dendrograms, constructed from the  $D_a$  and  $F_{ST}$  genetic distance matrix with a Pearson correlation coefficient of  $r = 0,97$ , show the Mallorquina and Menorquina cluster together, and near the Thoroughbred population. The Correspondence Analysis demonstrated that Asturcón, Jaca Navarra and Losina, are the breeds which contribute the most to the genetic diversity, for the first, second and third factor, respectively.

The Bayesian method gave the best results to select or exclude populations as origins of individuals, being this efficiency correlated with the level of genetic differentiation among the populations. The efficiency of microsatellites depends on the considered populations and there is a positive correlation between the efficiency and the number of microsatellites, but the genotyping costs do not justify a higher number of genetic markers than ten or twelve.

## II. INTRODUCCIÓN

## II. INTRODUCCIÓN.

### II.1. Concepto de raza.

La raza es según diferentes hipótesis, un proceso biológico objetivo o un artificio del hombre. A este respecto han surgido multitud de definiciones apoyadas en posturas encontradas que Rodero y Herrera (2000) clasifican en tres:

- Convencionalismo extremo: cualquier población tiene derecho a ser considerada como raza.
- Realismo extremo: sólo hay una definición correcta de raza.
- Posturas intermedias: el concepto de raza varía dependiendo de las situaciones.

Algunas de las definiciones de raza más representativas son las propuestas por:

- González Pizarro (1903): *"Colectividad de individuos que poseen un conjunto de caracteres distintivos y transmisibles por generación"*.
- Kronacher (1937): *"Por raza se entiende hoy en día, un grupo de animales de la misma sangre que sobre la base de su origen, de determinadas propiedades morfológicas y fisiológicas y de su empleo útil, presentan cierto parentesco, se distinguen por sus características exteriores y por la clase y el volumen de sus funciones, así como por sus necesidades en elementos vitales para la realización de dichas funciones, respecto a otros animales de la misma clase y, en igualdad de condiciones del medio exterior, producen descendientes iguales o parecidos"*
- Aparicio Sánchez (1956): *"Conjunto de individuos con caracteres morfológicos, fisiológicos y psicológicos propios, por los que se les distingue de otros de su misma especie y que son transmisibles por herencia dentro de una margen de fluctuación conocido"*.

- Alderson (1974): *"Grupo de animales de características similares que reproduciéndose entre sí dan una progenie del mismo tipo, dentro de los estándares publicados por la organización de registro"*.

- La FAO adopta la definición dada por Turton (1974): *"Grupo homogéneo, subespecífico, de animales domésticos que poseen características externas definidas e identificables que permiten distinguirlos a simple vista, de otros grupos definidos de la misma manera en la misma especie. También es un grupo homogéneo sobre el que, debido a la separación geográfica con otros grupos fenotípicamente similares, existe un acuerdo general sobre su identidad separada"*.

- Cavalli-Sforza (2000): *"Un grupo de individuos que pueden ser reconocidos como biológicamente diferentes respecto a otros"*.

Aunando estas definiciones se puede decir que la catalogación de una población animal como raza debe reunir al menos tres requisitos: homogeneidad morfológica entre sus integrantes, diferenciación de ellos respecto a grupos cercanos, y perpetuación de estas características diferenciadas a través de la descendencia.

De entre todas las definiciones surgidas a lo largo del tiempo, quizá la correspondiente a Orozco (1985), sea una de las más escépticas con respecto a la existencia de las razas: *"nadie puede impedirle a un ganadero, a un técnico o a cualquier persona que tenga acceso a un conjunto de animales definir una población concreta como raza. Si para ello se basa en unas características determinadas, objetivas, uniformes y distintas a las de otras poblaciones, puede hablar, si quiere, de una nueva raza. La raza es simplemente estar de acuerdo con unas características concretas y muy exigentes, perfección en color, tipo, porte, medidas de diferentes partes del cuerpo bien determinadas, etc. Y si la raza está definida así, no hay ninguna objeción que hacer. La raza, consciente o inconscientemente, ha sido hecha por el hombre, aunque con la intervención del medio actuando a través de la selección natural"*.

Aunque no se especifica cual debe ser el origen de una raza, en su proceso de formación, se pueden distinguir dos periodos, uno previo a su constitución desde el punto de vista zootécnico, y otro posterior en el que ya existe un reconocimiento administrativo, oficial y técnico.

Según Denis (1982), las razas pasan por los siguientes tipos:

- Subespecies geográficas, que son las existentes previas a la domesticación.
- Razas primitivas, en las que ha existido una limitada acción del hombre.
- Razas naturales, que suponen una etapa de transición hasta las actuales.
- Razas actuales, donde existe una intensa intervención humana pero conservando el carácter regional y/o nacional.
- Razas mejoradas, que poseen una proyección internacional.

## II.2. Biodiversidad

Las estimaciones sobre el número de especies de organismos vivos sobre la Tierra varían entre 2 y 100 millones siendo la mejor estimación alrededor de 10 millones, de las que actualmente menos del 0,5% son aves y mamíferos. Dentro de esta pequeña franja de biodiversidad se cuenta alrededor de una cuarentena de especies de animales domésticos. Estas especies han sido domesticadas por el hombre en el curso de los últimos 12000 años y son importantes económicamente por su contribución a la producción alimenticia y agrícola. En el curso del proceso de domesticación se han desarrollado razas separadas y genéticamente únicas para adaptarse al clima local y las demandas de la comunidad, constituyendo las diversas razas autóctonas. Quedan entre 4000 y 5000 razas de animales domésticos. Estas razas y las especies que ellas representan, además de aproximadamente 80 especies salvajes emparentadas, constituyen los recursos genéticos animales del mundo.

Desafortunadamente, durante los últimos años cada vez resulta más frecuente oír y leer sobre la progresiva desaparición de las razas autóctonas en el mundo. Sin embargo, hay que destacar que existen razones importantes por las que las razas autóctonas deben ser protegidas. Se pueden clasificar en tres:

- a) *Razones económicas:* Se trata de animales rústicos, perfectamente adaptados a su medio, incluso cuando se trata de zonas accidentadas o agrestes, donde los pastos son pobres y en algunas ocasiones escasos. Las hembras poseen una excelente fertilidad, son buenas madres, poseen una larga vida reproductora y necesitan de pocas atenciones veterinarias. Todas estas son

características deseables para una agricultura y ganadería sostenible de bajos costes.

b) *Razones genéticas:* Constituyen una reserva básica de genes que pueden ser importantes en el futuro de la ganadería cuando las demandas o gustos del consumidor varíen, ya que abren la posibilidad de contribuir a la formación de nuevas razas.

c) *Razones ecológicas y culturales:* Contribuyen al mantenimiento de una ganadería extensiva la cual favorece un buen equilibrio demográfico en zonas desfavorecidas. Forman parte del patrimonio cultural-ganadero de numerosas zonas rurales, contribuyendo a su atractivo turístico.

En la actualidad la FAO es el principal organismo internacional encargado de la conservación de los recursos genéticos animales (razas, líneas, variedades, poblaciones geográficas o genotipos individuales disponibles), entendiendo por conservación la administración del uso humano de la biosfera de manera que ella produzca el mayor provecho sustentable para las generaciones actuales, siempre manteniendo el potencial para satisfacer las necesidades y las aspiraciones de las generaciones futuras. Según la FAO una gestión eficaz de la conservación, a nivel mundial y para cada especie, reposa imperativamente sobre:

- la identificación y enumeración de las razas,
- su descripción y caracterización, para determinar sus cualidades particulares y sus posibles contribuciones, y para comprender qué razas pueden potencialmente proveer la mayor variedad de contribuciones futuras,
- el seguimiento de las estadísticas demográficas de cada raza y de la información referida a las razas en riesgo de desaparición,
- facilitar el uso de la mayor cantidad de razas posibles, ya que el correcto uso de una raza es ciertamente el medio más rentable para conservar el stock de genes para el futuro,
- la conservación de muestras de la mayor cantidad posible de razas bajo la forma de semen, ovocitos y embriones, para permitir la recreación en el futuro de una población desaparecida,

- la puesta en marcha de programas de educación y de formación sobre la conservación de los recursos genéticos y las técnicas de campo más efectivas,
- asistencia con el desarrollo de instrumentos políticos y legales a nivel nacional e internacional, y
- maximización de la participación de todos los socios indispensables para el éxito del programa.

Los programas de conservación de recursos genéticos animales pueden ser considerados como un importante componente dentro de los programas de conservación de la biodiversidad que, planteados en 1992 en la Conferencia de Río de Janeiro (Brasil), culminaron en diciembre de 1993 con la ratificación formal en la Convención sobre Diversidad Biológica con tres objetivos: a) conservación de la diversidad biológica, b) utilización sostenible de sus componentes y c) reparto justo y equitativo de los beneficios que genere su utilización.

En los análisis del Banco Mundial de Datos, las razas son clasificadas en siete categorías: Desaparecida, Crítica, en peligro, crítica-mantenida, en peligro-mantenida, no en peligro y estado desconocido. La clasificación está basada en el tamaño total de la población, el número de hembras reproductoras y la tendencia de la evolución del número de individuos (creciente, decreciente o estable). Si una raza está en el límite de dos categorías, se consideran otros factores, como el número de machos usados en Inseminación Artificial, el número de dosis de semen o el número de embriones acumulados y el número de rebaños. Otro factor tomado en cuenta es la existencia de un programa de conservación.

Las reglas utilizadas para determinar el estado de riesgo son las siguientes:

- Desaparecida: no es posible recrear la población. Esta situación es absoluta cuando no hay machos (o semen) ni hembras reproductoras (u ovocitos), ni embriones. En realidad la desaparición puede constatare bastante antes de la pérdida del último animal, gameto o embrión.
- Crítica: el número total de hembras reproductoras (HR) es inferior a 100 o el número total de machos reproductores (MR) es inferior o igual a 5. También se puede cuantificar por el tamaño total de la población (TTP) que debe ser



próximo a 100 y decreciente, y el porcentaje de hembras criadas en raza pura (HPR) es inferior al 80%.

- En peligro: HR entre 100 y 1000, MR entre 5 y 20. O, TTP próximo a 100 y creciente y HPR mayor del 80%. O, TTP próximo a 1000 y decreciente y HPR inferior al 80%.

- Las razas clasificadas como Crítica-Mantenida o En peligro-mantenida identifican a poblaciones críticas o en peligro para las cuales existen programas de conservación activos o son mantenidas por compañías comerciales o institutos de investigación.

- No en peligro: HR superior a 1000 y MR superior a 20. O, TTP próximo a 1000 y HPR próximo 100%.

- Estado desconocido: no existen datos del censo de animales.

### II.3. Sistemática y filogenia del caballo.

El primer antepasado conocido del caballo, el *Eohippus*, vivió en los tiempos del periodo Eoceno, hace aproximadamente cincuenta millones de años, y por los restos fósiles encontrados en la zona Oeste de los Estados Unidos de América se sabe que se trataba de un animal de apenas 35 cm de alzada con una morfología parecida a la del pécari actual. Las extremidades anteriores presentaban cuatro dedos y las posteriores tres con un primitivo dedo accesorio, y su mandíbula estaba adaptada a la alimentación herbívora.

Hacia finales del Eoceno (hace 38 millones de años), esta primitiva forma equina evolucionó, diferenciándose en dos grupos cuyos restos han sido localizados en dos entornos diferentes. Por un lado, el *Orohippus*, género fósil de Norteamérica, y el *Paleotherium* hallado en Europa, y que en la línea evolutiva desaparece sin que se puedan hallar sus teóricos descendientes. Estos animales poseían una alzada mayor, semejante a la de un jabalí, y poseían cuatro dedos en las extremidades anteriores y tres en las posteriores.

El siguiente eslabón en la escala evolutiva corresponde al *Mesohippus*, de la talla de una cabra, con solo tres dedos en cada extremidad, el del medio más desarrollado que los laterales, y los molares primeros tendentes a desaparecer. Su desarrollo

corresponde al periodo del Oligoceno, hace 36 a 25 millones de años, con restos profusamente encontrados en los estados de Dakota y Nebraska.

Los descendientes del *Mesohippus* se diversificaron durante el Mioceno, y es posible encontrarlos tanto en América (*Miohippus*) como en Europa (*Anchitherium*), aunque este último desapareció. En el *Miohippus* los dedos laterales no tocan el suelo y la superficie de frote de las muelas es invadida por un cemento similar al de los équidos actuales. A partir de este momento todo el desarrollo evolutivo se realizará en llanuras y praderas, con un abandono definitivo del hábitat boscoso.

Al *Miohippus* siguió el *Merychippus* con más de veinte especies diferentes que vivieron en los estados de Oregón, Montana, California, Texas y Florida. Los fósiles encontrados hacen suponer que eran animales con la talla de un poni, ágiles, muy aptos para correr, y con una alimentación basada en los pastos de gramíneas. Algunas de las especies del *Merychippus* evolucionaron al finalizar la Era Terciaria, por un lado a géneros como el *Hipparium* y el *Mennipus*, que migraron hacia zonas de Asia y Europa y terminaron por desaparecer, y por otro lado al *Pliohippus*, con muelas muy semejantes a las de los équidos actuales y con un solo dedo en cada extremidad, pero con rasgos craneales y detalles osteológicos de las extremidades diferentes a los del caballo actual. Se considera por algunos naturalistas que el género *Plasihippus*, cuyos fósiles se han descubierto en Texas, Idaho y California, podría ser el eslabón entre el género *Equus* actual y el *Pliohippus*.

Al llegar el Plioceno, con la Era Cuaternaria, sólo quedaba el género *Equus* en América del Norte, representado por especies parecidas a los caballos, hemiones, asnos y cebras, pero al llegar el Pleistoceno, y concretamente tras la cuarta glaciación, hace 180000 años, desaparecieron todos los representantes de este género de América del Norte, pero este género se había ido extendiendo por el mundo, desde Alaska por el istmo de Bering, pasó a Asia y desde allí a Europa y África, y también pasó a América del Sur, aunque en este último caso también terminó por desaparecer.

Los caballos propiamente dichos más antiguos que se conocen del Viejo Mundo son: el *Equus mosbachensis* de la Europa central, probable forma primitiva del *Equus caballus*, y el *Equus sanmenensis* en China. Se estima que el verdadero *Equus caballus* apareció en la última parte de la Era Cuaternaria junto al *Equus przewalskii*, al que algunos autores consideran parte de la misma especie.

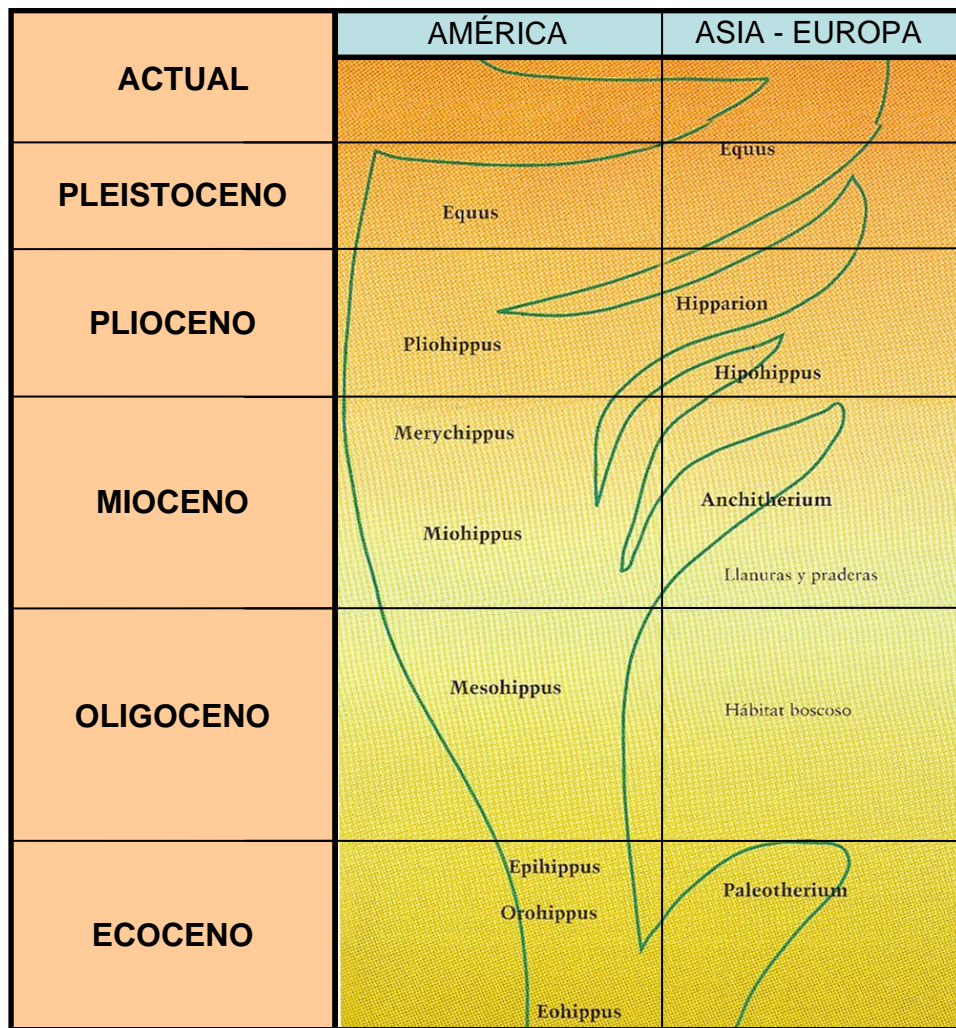


Figura 2.1.: Representación esquemática de la filogenia del género Equus.

#### II.4. Aspectos genéticos de la domesticación. El origen de las razas.

La domesticación parte de un proceso de relación basado en interacciones sociales entre el hombre y el animal conduciendo a modificaciones morfológicas y genéticas en él, que contrastan marcadamente con las de sus congéneres salvajes, y con la estructura social del hombre paleolítico.

A partir de la domesticación, es decir, ya entrado el neolítico, se conforman distintos grupos humanos en distintos sitios y épocas, probablemente con organización tribal en su estructura social, con algunos animales y plantas domésticas.

Existen dos tipos de evidencias basadas en los restos fósiles sobre el inicio de la domesticación del caballo, evidencias directas e indirectas. Las primeras están

relacionadas con restos artísticos, textuales o funerarios (tumbas donde los caballos han sido enterrados con aperos de monta, carros,...) en los que no hay duda del empleo del caballo como animal domesticado para la monta o para la tracción. Las evidencias indirectas se obtienen por ciertas características en los huesos y artefactos, e incluyen análisis osteométricos, distribuciones biogeográficas, paleopatología,...; aunque estas puedan sugerir más de una explicación.

El asentamiento de Dereivka en Ucrania datado sobre el 4500-3500 a de C, fue tomado las pasadas tres décadas como la evidencia más temprana de la domesticación del caballo (Bökönyi, 1978; Bibikova, 1986; Telegin, 1986 Mallory, 1989; Anthony y Brown, 1991; Gimbutas, 1991;). Más recientemente otro asentamiento correspondiente a la etapa del neolítico en Kazastán se ha asociado con los orígenes del caballo doméstico (Brown y Anthony, 1998). Sin embargo, una cuidadosa consideración de ambos asentamientos sugiere que la mayoría de los caballos eran salvajes (Levine, 1999a; Levine, 1999b), aportando entre otras razones la alta mortalidad de los caballos durante su etapa más productiva, que son características típicas de animales cazados, y la ausencia de ciertas anomalías en la vértebra torácica caudal, que son típicas de animales adaptados a la monta (Levine, 1999b; Levine y col., 2000).

La primera evidencia encontrada en una tumba, acompañada por artefactos que indiscutiblemente están asociados a la monta o la tracción, se remonta al principio del segundo milenio a de C (Postgate, 1986; Zarins, 1986; Renfrew, 1987; Piggott, 1992; Kuzmina, 1994; Littauer and Crouwel, 1996;) y no existe ninguna evidencia artística o textual asociada a la domesticación del caballo anterior al fin del segundo milenio a de C (Renfrew, 1987; Piggott, 1992; Levine, 1999b).

Además de las teorías hasta ahora expuestas han surgido otras nuevas basadas en el estudio de marcadores moleculares del ADN, especialmente ADN mitocondrial (Vilà y col., 2001; Jansen y col., 2002) que sugieren básicamente que al contrario de lo ocurrido con bóvidos, ovejas y cabras, los cuales se domesticaron en un tiempo y espacio reducido, la domesticación del caballo se produjo en más de un lugar y en periodos de tiempo diversos.

Estos estudios están basados en el estudio de una región de ADN mitocondrial en más de 600 caballos pertenecientes a 25 razas diferentes distribuidas

mundialmente, comparadas con muestras de ADN de caballos que vivieron en Suecia y Estonia hace aproximadamente 2000 años y con ADN de caballos de hace 28000 años que estaban preservadas en el hielo de Alaska.

El estudio del ADN mitocondrial refleja una diversidad muy alta en las razas actuales, comparada con la encontrada en los restos fósiles, que no puede ser justificada por una tasa mutacional elevada, sino que sería consecuencia de la incorporación de numerosos orígenes maternos a lo largo de diversos periodos de tiempo y dispersa por la geografía de Eurasia. Jansen y col. (2002) estiman en un número de 77 hembras salvajes o más, el stock original de caballos domesticados.

## II.5. Origen y evolución histórica de las razas equinas incluidas en el estudio.

La mayor parte de los estudios apuntan un origen celta a las razas del norte peninsular (Asturcón, Pottoka, Jaca Navarra, Losina y Caballo de Pura Raza Gallega), según el cual los caballos desaparecidos de la cornisa cantábrica durante el mesolítico fueron reintroducidos en el siglo VIII a de C por los celtas, llegando a este territorio como animal domesticado, en contraposición con los salvajes que habitaban con anterioridad en toda la zona. Este primitivo caballo celta se correspondería con el denominado *Equus gracilis* por Ewart, quién tras una serie de experimentos de hibridación con équidos (poni de Exmoor, Gotland, Islandés, y Shetland) llegó a unas conclusiones publicadas en 1904 en la revista Nature. La descripción que Ewart hace del poni celta es la siguiente: " *Carencia de espejuelos en los miembros posteriores; cabeza pequeña, ligeramente achatada; oreja corta, grupa caída, pelo largo, abundante en todo el cuerpo y particularmente en las quijadas (por el invierno); crines de la frente y del cuello largas, abundantes y crespas. De pequeña alzada.* "

Ruy de Andrade sostiene: "Los celtas tendrían un poni, denominado en portugués "Garrano" del cual derivarían los actuales caballos de la zona cantábrica: gallego, asturiano, vasco-navarro, ...".

Aparicio, investigador de las actuales razas caballares, en su obra "Zootecnia especial" (1960) dice textualmente: "De la tercera forma prehistórica caballar, caballo celoide o cóncavo del Cuaternario (las otras serían el Tarpán, *Equus gmelini*, y el Caballo de Przewalski, *Equus przewalskii*), no identificado aún y confundido desde luego con el Tarpán, descenderían en primer lugar el *Equus gracilis* de Ewart, generador de las "jaquitas celtas" del Norte peninsular".

Algunos autores como García-Dory (1980) sostienen que el origen de las actuales razas cántabras no estaría solo en el primitivo caballo celta sino que son el resultado del cruce de éste con las razas autóctonas existentes en la zona, aunque ambas procedían de un mismo caballo ancestral, el caballo de Solutré.

De cualquier modo, las primeras referencias escritas sobre este tipo de caballo domesticado aparecen entre los siglos III y II a de C. Varias fuentes clásicas coinciden en la descripción de estos caballos. De ellos dicen que había dos clases, unos pequeños y bastos pero muy rudos, que llaman Asturcones, y otros esbeltos y más finos que llaman Thieldones (Celdones), aunque hay otra interpretación, la que corresponde al libro "A History of British Native Ponis" (Dent y Goodall, 1962) donde se habla de una única raza que recibía distinto nombre según la denominasen los propios astures, Celdones, y si eran los romanos, Asturcones.

Durante estos siglos posteriores a Cristo, el uso que se hizo de estos animales fue eminentemente guerrero por parte de las poblaciones autóctonas contra la dominación romana, aunque también se empleaban como animal de carga y constituían un símbolo religioso y mitológico relevante.

Durante la Edad Media siguieron cumpliendo muchos de estos papeles, se tienen noticias de su utilización en la guerra de la Reconquista, y los campesinos los utilizaban como moneda de cambio de sus impuestos, además de seguir teniendo utilidad para el transporte, acarreo y trabajos agrícolas.

En 1562, el Corregidor de Oviedo y Procuradores del Principado, a requerimiento de una Orden Real promulgan una medida que pretende el cruce de estos animales con otras razas con el fin de dotarles de mayor porte, acorde a los intereses y necesidades del momento. Un ejemplo de este objetivo fue la expedición de la Armada Invencible donde se embarcaron ejemplares de ponis cántabros. Los historiadores ingleses señalan este hecho, y los zootécnicos piensan que esto pudo haber tenido influencia en los ponis actuales de las islas Británicas.

En la colonización de América del siglo XVII se introdujeron igualmente caballos del cantábrico que posteriormente dieron lugar al poni Galiceño de Méjico.

Durante los siglos XVIII, XIX y buena parte del XX se produjeron mestizajes y una decadencia evidente de todas las razas.

En el caso de las dos razas mediterráneas, Mallorquín y Menorquín, parece que también pudieran estar emparentadas con los primitivos caballos celtas a través del denominado caballo catalán (Martínez y col., 1996), una raza ya extinguida en la actualidad y con la que comparte numerosas similitudes morfológicas, aunque ambas razas parecen englobarse más claramente entre aquellas de perfil subconvexo a la que también pertenecen, la Lusitana, Española, Murgese y Berberisca. La influencia que a lo largo del tiempo han tenido de otras razas es un hecho, especialmente con el caballo Árabe durante la ocupación islámica.

En la actualidad existe cierto apoyo estatal hacia las asociaciones de criadores para la conservación de estas razas. El 30 de julio de 1979 se establecía por primera vez el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España, al que siguió un Real Decreto 1682/1997 de 7 de noviembre por el que se actualizaba dicho Catálogo Oficial, vigente hasta el 22 de marzo de 2000, fecha de entrada en vigor de la Orden de 3 de marzo de 2000 por la que se dispone la inclusión de dos razas nuevas en el catálogo oficial de razas puras actual. Todas las razas incluidas en este estudio pertenecen al Catálogo Oficial y tienen asignada la categoría de raza Autóctona de Protección Oficial.

Con fecha del 31 de octubre de 2002 se publicó un Real Decreto por el que se regula en el ámbito de las razas equinas, el régimen jurídico de los libros genealógicos, las asociaciones de criadores y las características zootécnicas de las distintas razas.

## **II.6. Descripción morfológica de las razas autóctonas incluidas en el estudio.**

### **II.6.1. RAZA ASTURCÓN.**

EL Asturcón según la clasificación de Baron es un animal elipométrico, subcóncavo y brevilíneo. El perfil de la cabeza varía de recto a subcóncavo, cabeza armónica aunque algo voluminosa en las hembras. Los ollares son amplio y los labios gruesos, el tupé es abundante, sobre todo en los machos, y las orejas son móviles, pequeñas y bien implantadas. El cuello es recio, fuerte y bien insertado en el pecho. La cruz es destacada y el dorso ligeramente ensillado. La grupa es inclinada y la cola es de nacimiento bajo y muy poblada.



Los aplomos son regulares. El vientre es algo voluminoso. El pecho es amplio, fuerte y de gran capacidad. Las extremidades son delgadas pero potentes, los cascos pequeños y redondos están bien apoyados. La existencia de cerneas fuera del invierno es abundante.

La capa aceptada en el Libro Genealógico es negra, en diferentes gamas, en su totalidad, aunque puede presentar una pequeña estrella; si bien ocasionalmente nacen animales alazanes que no son aceptados como reproductores. Otra capa histórica es la castaña, aunque los animales castaños tampoco se incluyen en el Libro Genealógico.

Durante las épocas frías de invierno el pelo crece en cantidad y longitud, se trata de un pelo más claro y castaño. El potro recién nacido posee una pelusa interior suave y continua, y el color de su pelaje es gris-chocolate, encontrándose alrededor de la boca una zona de decoloración típica.



**Figura 2.2.:** Raza Asturcón.



El 90% de las hembras posee caninos en la mandíbula inferior, lo que nos da idea del arcaísmo de la raza.

En la actualidad conviven diferentes formas de explotación de los Asturcones, algunos perviven en semilibertad en las montañas asturianas, otros permanecen en los prados debido a que los dueños no tienen derecho a los pastos comunales o porque su número es pequeño, y algunos son utilizados para doma en diferentes Clubes Hípicos. El área original de distribución geográfica de esta raza incluye diversas sierras de la provincia de Asturias, si bien parece que la Sierra del Sueve ha sido el reducto donde los Asturcones se han conservado sin influencias de otras razas, hasta el momento en que surgieron diferentes iniciativas de recuperación y que desembocaron en la creación en 1987 de la Asociación de Criadores de Ponis de Raza Asturcón (ACPRA), organismo que se encarga en la actualidad de la gestión del Libro Genealógico y la conservación y promoción de la raza, y que cuenta con un censo actual de 800 animales.

## II.6.2. RAZA JACA NAVARRA

Tiene diferentes denominaciones, poni navarro, caballo navarro, caballo vasco-navarro, o Jaca Navarra. Recibe también otras denominaciones no tan técnicas según la localización geográfica: caballito de Andía, de la Barranca o de las Améscoas.

Es una animal de escasa alzada que oscila entre 1,22 y 1,36 m. pero proporcionado.

La cabeza es un poco voluminosa, las orejas pequeñas y los ojos vivos, con potentes maseteros y apófisis zigomáticas pronunciadas, dando la sensación de cabeza cuadrada terminada en punta. Los ollares muy dilatados, el labio o belfo superior muy dilatado, puede estar dotado de bigote, y el inferior aparece levemente caído. Los dientes dotados de una fuerte pigmentación y con prematuro desgaste. El perfil es recto levemente subcóncavo.

El dorso es más bien recto, con vientre recogido y costillares bien formados. La grupa es redondeada sin excesivo hundimiento en la parte superior, prolongándose su musculatura de arriba abajo. La cola bien insertada y abundantemente dotada.

Extremidades finas, de articulaciones proporcionadas y escasa cernejas, aunque fuertes y robustas. De aplomos casi perfectos, en ciertas ocasiones pecan por ser algo cerrados de corvejones. El casco es pequeño, coriáceo, muy duro y compacto.

La piel es delgada y fina. La capa típica es la castaña, preferentemente de tonos oscuros y carece de manchas de color blanco (estrellas, cordones, calzados, ...) en cara y extremidades.

Hoy en día la zona de influencia de esta raza se encuentra reducida a pequeños enclaves o municipios que se ubican en las faldas de las Sierras de Urbasa y Andía, además de otros núcleos alejados de su enclave natural (Huesca, Aranguren, zonas próximas a Izalzu y Goizueta). También se mantiene un núcleo de conservación y referencia en la finca Sabaiza (1982), gestionada por el ITG-Ganadero, cuyos antecedentes provienen de los años 30.

En 1999 se constituye la Asociación de Criadores de Ganado Equino Jaca Navarra (JACANA), y el 11 de julio de 2001 a través de una Orden Foral, se la reconoce como gestora del Libro Genealógico de la raza caballar "Jaca Navarra" y se aprueba la reglamentación específica de dicho Libro Genealógico. En la actualidad existe un censo de más de 200 animales.



Figura 2.3.: Jaca Navarra.



Figura 2.4.: Zona geográfica de influencia histórica de la Jaca Navarra (trama rayas oblicuas) y reducto actual en el que se ubica (sombreado rojo).

### II.6.3. RAZA CABALLO DE PURA RAZA GALLEGA.

Se distribuye por el noroeste de España, en la Comunidad Autónoma de Galicia. También recibe las denominaciones de Poni gallego, Caballo gallego, Faca Galizana, Burras, Faco o Cebro.

Siguiendo la sistemática de Baron recibe la calificación de elipométrica, rectilínea y longilínea.

La cabeza es siempre grande, pesada y generalmente alargada. Su longitud supera siempre un tercio de la alzada, la frente plana no muy ancha y con abundante tupé. Órbitas mal delimitadas y salientes, ojos pequeños, orejas cortas, móviles y velludas. Tiene los labios muy desarrollados, firmes y duros, frecuentemente con un bigote en el superior y el hocico es pequeño con ollares no muy anchos.

El cuello es corto, recto y piramidal. Plano y descarnado, se inserta de forma poco armónica en la espalda. Lo puebla una abundante crinera, con pelos largos y bastos.

De cruz destacada y región dorsolumbar arqueada por el peso del vientre, posee lomos estrechos y despegados de la grupa.

El tórax es muy aplanado, con los costillares poco arqueados, tiene un pecho estrecho y hundido y espaldas deprimidas. Su vientre es voluminoso, vientre de vaca, a consecuencia de una alimentación excesivamente fibrosa.

Tiene la grupa derribada, regularmente oblicua, y nalga de escaso desarrollo muscular.

Las extremidades anteriores son cortas en comparación con la alzada; de aplomos regulares, con cierta tendencia general al izquierdo y a los animales un poco plantados hacia delante. Espalda corta y poco oblicua. En las extremidades posteriores son estrechos de corvejones y algo zancajosos. Ambas, delanteras y traseras, poseen cañas delgadas recubiertas de una piel fina y tersa.

La piel es gruesa y adherida al tejido muscular subcutáneo, con un pelaje abundante que varía con las estaciones. Poseen cernejas pobladas. El bigote

constituye un carácter racial muy significativo y está presente en el labio superior de un buen número de ponis gallegos.

El casco es de volumen pequeño y poseen un estuche córneo excelente con la tapa compacta, poco lustrosa sin ceños ni resquebrajamientos. Posee espejuelos en ambas extremidades.

La capa característica del Caballo de Pura Raza Gallega es la capa castaña que alterna con otras menos numerosas, alazanas, negras y tordas. Son frecuentes las manchas blancas en la cabeza, estrellas y luceros, y en la parte inferior de las extremidades, animales calzados.

Esta raza se usa para producción de carne y para montar, y posee también un valor turístico. Una de las fiestas más tradicionales y populares en Galicia son los "curros" (área cercada donde los caballos se exhiben durante la feria). Esta feria consiste en llevar los animales semisalvajes desde las montañas gallegas, una vez al año (normalmente en verano), para ser marcados con el hierro, cortar sus crines y colas y venderlos en el "curro".

Según datos recogidos por SERGA (Sociedad Española de Recursos Genéticos Animales) el censo en 1997 de la raza oscilaba ampliamente entre 10000 y 100000 cabezas. En 1997 se constituyó la Asociación de Ganaderos del Pura Raza "*Cabalo Galego*", siendo esta asociación en la actualidad la que se encarga de gestionar el Libro de Registro de la Raza.



**Figura 2.5.:** Caballo de Pura Raza Gallega.

#### II.6.4. RAZA POTTOKA.

Según la Orden dada por el Gobierno Vasco a través de su Departamento de Industria, Agricultura y Pesca donde se intenta unificar criterios orientados a la recuperación y mejora, el prototipo racial de la raza sería el siguiente:

La capa del Pottoka es negra o castaña y presenta borra o lanas en invierno debido al duro ambiente invernal. En el conjunto de la raza, pocos son los animales de capa alazana o torda, aunque existe un amplio número de capa pía, consecuencia del cruce con razas como el Welsh, si bien estos animales se consideran no aptos para su cruce en pureza.

La cabeza posee un perfil subcóncavo aunque presenta dos ligeras convexidades, una a nivel inferior de la testuz y otra a nivel del dorso de los ollares, que produce un cierto retraso del labio inferior con respecto al superior, y unos ollares amplios dirigidos hacia delante. En la mandíbula inferior presenta barbas o barboquejo y bigotes en los belfos. Las órbitas oculares son salientes y marcadas con ojos grandes, vivos, expresivos, y de color oscuro. Las orejas son de talla pequeña y muy móviles, con pelo más abundante en invierno, bien implantadas, colocadas en lo alto, hacia delante y separadas en la base aunque mirándose ligeramente. Entre ellas aparece el tupé, más abundante en los machos.

En general, la cabeza es armónica, seca y piramidal. El cuello es corto, recio y fuerte, con amplia inserción y bien proporcionado con respecto al tronco y la cabeza. Presenta crinera simple hasta la cruz, que cae sobre un solo flanco, de crines lisas, abundantes y largas.

El tronco se establece dentro de un perfil cóncavo. Posee una cruz pronunciada, que se hace más aparente a causa de su región dorso-lumbar ligeramente ensillada aunque amplia, más aún en las hembras. Las espaldas tienden a la rectitud, aunque nunca han de ser rectas, dando una base de articulación muy buena a las extremidades inferiores. El pecho es amplio para una óptima inserción del cuello. La región costal se asienta sobre unas costillas bastante convexas que dan lugar a un vientre de apariencia voluminosa, especialmente en los animales que pastan en el monte. La grupa es simple y ligeramente caída, más larga que ancha que termina en una región caudal prominente, dando lugar a una cola de nacimiento bajo, con abundantes pelos lisos.



Su altura a la cruz varía entre 115 y 147 cm, no obstante para la Sección A del Libro Genealógico no deben exceder de 130 cm.

Las extremidades están bien proporcionadas con el resto del cuerpo, son delgadas pero potentes, con articulaciones cortas y tendones destacados. Presentan cerneas con pelos no muy largos y espolones. Los cascos son pequeños, totalmente negros y muy duros, cubiertos discretamente de pelos cortos hasta su corona. Los aplomos de las extremidades anteriores son correctos, mientras que en las posteriores son izquierdas o zancajosos.

El Libro Genealógico de la Raza Pottoka se creó en 1995 a raíz de su reconocimiento Oficial en agosto de ese mismo año.

El área de distribución geográfica de esta raza corresponde al norte de Álava, casi toda Vizcaya y Guipúzcoa, el sur de Iparralde y el norte de Navarra.



**Figura 2.6.:** Raza Pottoka.

#### II.6.5. RAZA LOSINA.

La raza Losina según Mason (1960) recibe su denominación del área original de cría, el valle de Losa, en el norte de la provincia de Burgos. Esta raza mantuvo sus efectivos hasta los años 50, pero posteriormente, y debido principalmente a la

mecanización del campo, al cruce con razas de aptitud cárnica y con ganado asnal para la producción mulatera, su población descendió hasta llegar en 1986 a los límites más críticos de toda su historia. En ese año se inició el proyecto de recuperación de la raza creándose posteriormente en Pancorbo (Burgos) el primer Centro de Cría y Selección del caballo Losino. En la actualidad el censo supera los 200 animales inscritos en el Libro de Registro de la Raza.

El patrón racial de la raza Losina según la Asociación de Criadores (1988) es el siguiente:

Se trata de un caballo eumétrico de entre 330 y 350 kg de peso, posee un cabeza de perfil recto o subconvexo, con un característico abultamiento a nivel de los nasales que aparece más acentuado en los machos. El tamaño de la cabeza es relativamente grande y de rasgos finos. Perfil frontal recto, a veces, con una ligera ondulación a nivel de los nasales. Orejas pequeñas, delgadas y formando un arco de concavidad interior. Frente plana. Ojos a flor de cara, grandes, vivos y expresivos. Ollares amplios. Labios levemente gruesos.

El cuello es recto o suavemente ondulado en su borde superior. Cuello robusto, de amplia inserción en el pecho, con tendencia abultarse en su parte inferior, que se hace convexa.

Se considera una alzada media en hembras de 135 cm y en machos de 140 cm.



**Figura 2.7.:** Raza Losina.

El pecho es amplio, cruz buena, dorso algo ensillado, con lomos anchos.

Las extremidades anteriores son finas, con buenas articulaciones, vasos y tendones muy ostensibles exteriormente. Espalda amplia, buen brazo, caña fina, cuartillas cortas y cascos pequeños, duros y negros. La grupa es amplia, redonda y derribada. La cola es de inserción baja y hundida entre los isquiones, larga, muy poblada y negra.

En cuanto a las extremidades posteriores, el muslo y la pierna están bien proporcionados, corvejones limpios, a veces algo cerrados. Las regiones situadas por debajo de los corvejones son análogas a las de las extremidades anteriores.

El pelo de las crines y de la cola es largo y abundante, especialmente en invierno como defensa del frío.

La Asociación de Criadores reconoce solo la capa negra en su variante morcillo, pudiendo presentar tonalidades rojizas en invierno y siendo en verano más oscura y brillante. Es frecuente la aparición de lucero en la frente.

#### II.6.6. RAZA MALLORQUINA.

El área de distribución de esta raza se circunscribe a la isla de Mallorca. En 1980 el patronato de razas Autóctonas de Mallorca (P.R.A.M.) en su deseo de iniciar la recuperación de la raza comienza la investigación para inventariar el número de caballos y yeguas que se identifican con los caracteres propios de la raza, censándose en aquel momento de 12 a 20 yeguas y de 5 a 7 sementales, comparados con los miles de animales que existían a principios de siglo. A fecha de 1997 el censo era de 75 animales.

En cuanto a los caracteres generales del animal de esta raza, se trata de un caballo eumétrico, sublongilíneo y de perfil ligeramente convexo. De silueta esbelta.

Posee una cabeza alargada y descarnada, perfil ligeramente convexo, orejas cortas, derechas y pobladas. Acusadas órbitas oculares, mirada viva, morro amplio y fuerte. Ollares poco destacados. Cuello corto y profundo, no muy grueso, bien aferrado al costillar y con abundante cabellera de pelo grueso y fuerte. Cruz destacada y no muy musculosa. Costillar arqueado, amplio y musculoso, dorso recto con tendencia a ensillarse con la edad. Vientre no excesivamente voluminoso.



Espalda alargada. Grupa larga e inclinada, seca de carnes. Cola de inserción baja, casi siempre en reposo, con el pelo duro y grueso. Extremidades anteriores bien aplomadas, poco musculadas. Extremidades posteriores, ijar y ancas, planas, descarnadas. Cascos amplios y fuertes. Capa negra en la que se admiten todas las variantes. También se aceptan manchas blancas en la cara.



Figura 2.8.: Raza Mallorquina.

#### II.6.7. RAZA MENORQUINA.

Esta raza se enclava geográficamente en la isla de Menorca. Su recuperación comenzó en 1988 cuando el Consejero de Agricultura y Pesca de la Comunidad Autónoma de las Islas Baleares y el Presidente del Consejo Insular de Menorca, dirigen escritos al presidente del Registro Matrícula de Caballos y Yeguas de Pura Raza, solicitando que esta raza sea reconocida y aceptado el registro fundacional que el Consejo tiene abierto para la misma. Los resultados de la inscripción en el Registro fundacional fueron muy superiores a los previstos inicialmente, especialmente respecto a la cantidad de solicitudes recibidas en muy poco tiempo, dando como resultado la existencia de más de 300 ejemplares que respondían a los caracteres definidos por el profesor Sánchez Belda, a quien se encomendó un estudio previo sobre la existencia de esta raza en Menorca.

El patrón racial de la raza Menorquina comprende los siguientes caracteres morfológicos generales. Se trata de animales subconvexos o rectilíneos, eumétricos y

longilíneos, de silueta esbelta. La capa es negra, admitiéndose todas sus variantes. Se aceptan manchas blancas en la cara y extremidades, siempre que sean de extensión reducida.

Poseen una cabeza alargada, de tamaño mediano, descarnada y armónica. De perfil fronto-nasal recto aunque muestra una ligera subconvexidad. Orejas de tamaño mediano a pequeño, de correcta implantación, con las puntas ligeramente divergentes y móviles. Ojos con las órbitas prominentes y de mirada viva. Ollares poco destacados lo que contribuye a dar a la cabeza una forma alargada. Cuello robusto de longitud mediana, ligeramente arqueado, musculado y potente, con buena inserción en la cabeza y el tronco. Crines fuertes y abundantes. Tronco alargado con cierta tendencia a la reducción del diámetro transversal. Cruz estrecha pero poco destacada. Espalda recta con discreta musculatura.



**Figura 2.9.:** Raza Menorquina.

Grupa ligeramente caída. Nacimiento de la cola bajo sin que se eleve por encima de la horizontal de la grupa. Pecho medio, costillar un poco aplanado. Vientre recogido. Extremidades largas y bien aplomadas. Brazos y antebrazos robustos. Muslo poco musculado como ocurre con las ancas, pierna relativamente corta. Cañas finas con tendones marcados y fuertes.

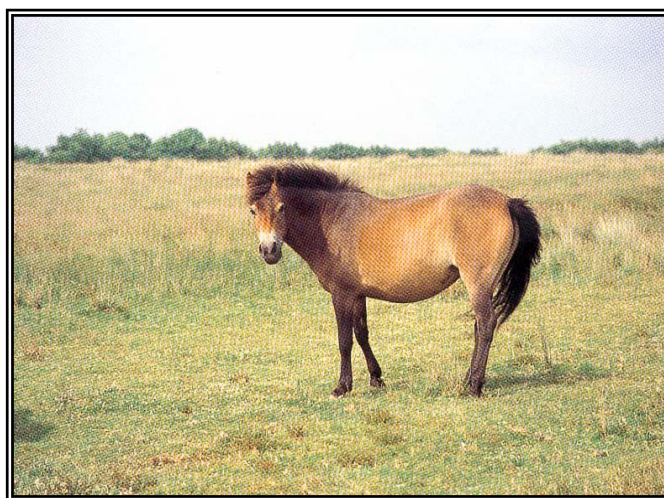
## II.7. Otras razas europeas de caballos de pequeña alzada de origen celta.

El llamado arco atlántico europeo posee un conjunto de razas equinas de gran riqueza, con un enorme parecido entre ellas, como consecuencia del ya mencionado posible origen común. Las más importantes son:

### II.7.1. RAZA EXMOOR

Originarios de los páramos de Exmoor, al Sudoeste de Gran Bretaña, pueden localizarse aún hoy pequeñas manadas de estos ponis en libertad. Es considerado como el descendiente directo en el Reino Unido de los antiguos ponis célticos, y acumula toda una serie de arcaismos que muestran su antigüedad como raza.

Es una animal de alzada no superior a los 128 cm, capa castaña o baya, con ciertas particularidades; decoloración en los flancos, pliegues de las extremidades y alrededor del hocico. Perfil cóncavo, al igual que el resto de ponis de origen celta.



**Figura 2.10.:** Raza Exmoor.

### II.7.2. RAZA DARTMOOR

Es una raza originaria de los páramos de Dartmoor (Devonshire), al sur de Exmoor.

Se trata de un poni cuya alzada no debe superar los 128 cm, admitiéndose las capas negras, bayas, castañas y alazanas, aunque presenten algunas manchas blancas que siempre deben ser pequeñas. Perfil de la cabeza cóncavo o subcóncavo.

El Dartmoor ha recibido ciertas influencias de sangres foráneas, especialmente del Shetland, a finales del siglo pasado.



Figura 2.11.: Raza Dartmoor.

### II.7.3. PONI WELSH

Es el poni de las montañas de Gales.

Puede presentar cualquier capa, salvo las pías y la overas aunque los negros (o de capa muy oscura) son considerados los más representativos, si bien en la actualidad han experimentado un gran auge las capas tordas.

Su alzada no puede superar los 122 cm. Se trata de una animal con cabeza pequeña pero ancha, mostrando un perfil subcóncavo.



Figura 2.12.: Raza Welsh.



#### II.7.4. RAZA HIGHLAND

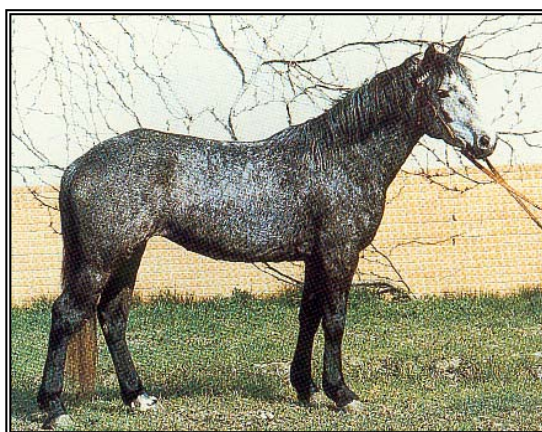
Poni de origen escocés. Su alzada no excede los 140 cm, y muestra capa baya o torda, pudiendo mostrar raya de mulo e incluso cebraduras en las extremidades, expresión bien clara de su arcaísmo como raza. El poni occidental es un animal que muestra una cabeza proporcionada, con perfil subcóncavo.



**Figura 2.13.:** Raza Highland.

#### II.7.5. RAZA CONNEMARA

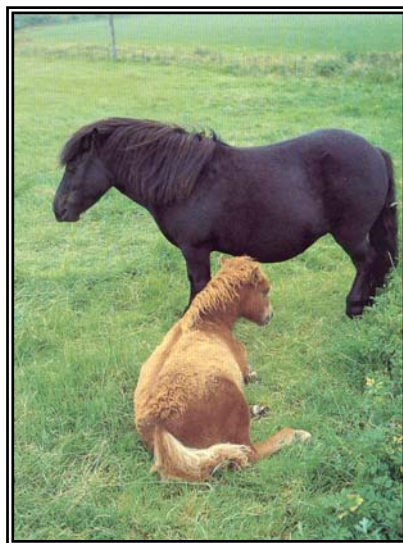
Es el representante irlandés de los ponis celtas. Se trata de una raza que ha sufrido numerosos cruces a lo largo de su historia con razas de muy diversa procedencia, desde Pura Sangre Inglés, hasta Árabe. Como resultado se ha obtenido un poni de alzada hasta 142 cm, y aspecto más redondeado, lo que le confiere una morfología de caballo de tiro ligero, pero que mantiene el perfil subcóncavo, elipometría y espaldas inclinadas.



**Figura 2.14.:** Raza Connemara.

#### II.7.6. RAZA SHETLAND.

Originario de las islas Shetland, situadas al norte de Escocia, hoy en día es el poni más extendido por el mundo. La alzada a la cruz no puede exceder los 107 cm. Las capas más corrientes son negro, castaño, y bayo, siendo abundantes los píos y alazanes. La cabeza es pequeña y de perfil subcóncavo. Las crines son abundantes y la cola fina y larga.



**Figura 2.15.:** Raza Shetland.

#### II.7.7. RAZA GOTLAND.

Es oriundo de la isla Gotland, en Suecia. Es un poni de capa negra, baya o alazana, con decoloración en el hocico y una alzada que no debe superar los 123 cm. Presenta un perfil subcóncavo-recto. Ha recibido cruzamientos con ponis Welsh y en la actualidad su cría está siendo muy potenciada.



**Figura 2.16.:** Raza Gotland.

#### II.7.8. RAZA ISLANDES.

Raza llegada a Islandia posiblemente alrededor de los años 800-900 de nuestra era procedente de los países nórdicos, ha evolucionado desde entonces en esta isla recibiendo aportes de otras razas, entre ellas, Highland. Presenta las características típicas de los ponis célticos, perfil subcóncavo, animal elipométrico y espalda inclinada.



**Figura 2.17.:** Raza Islandes.

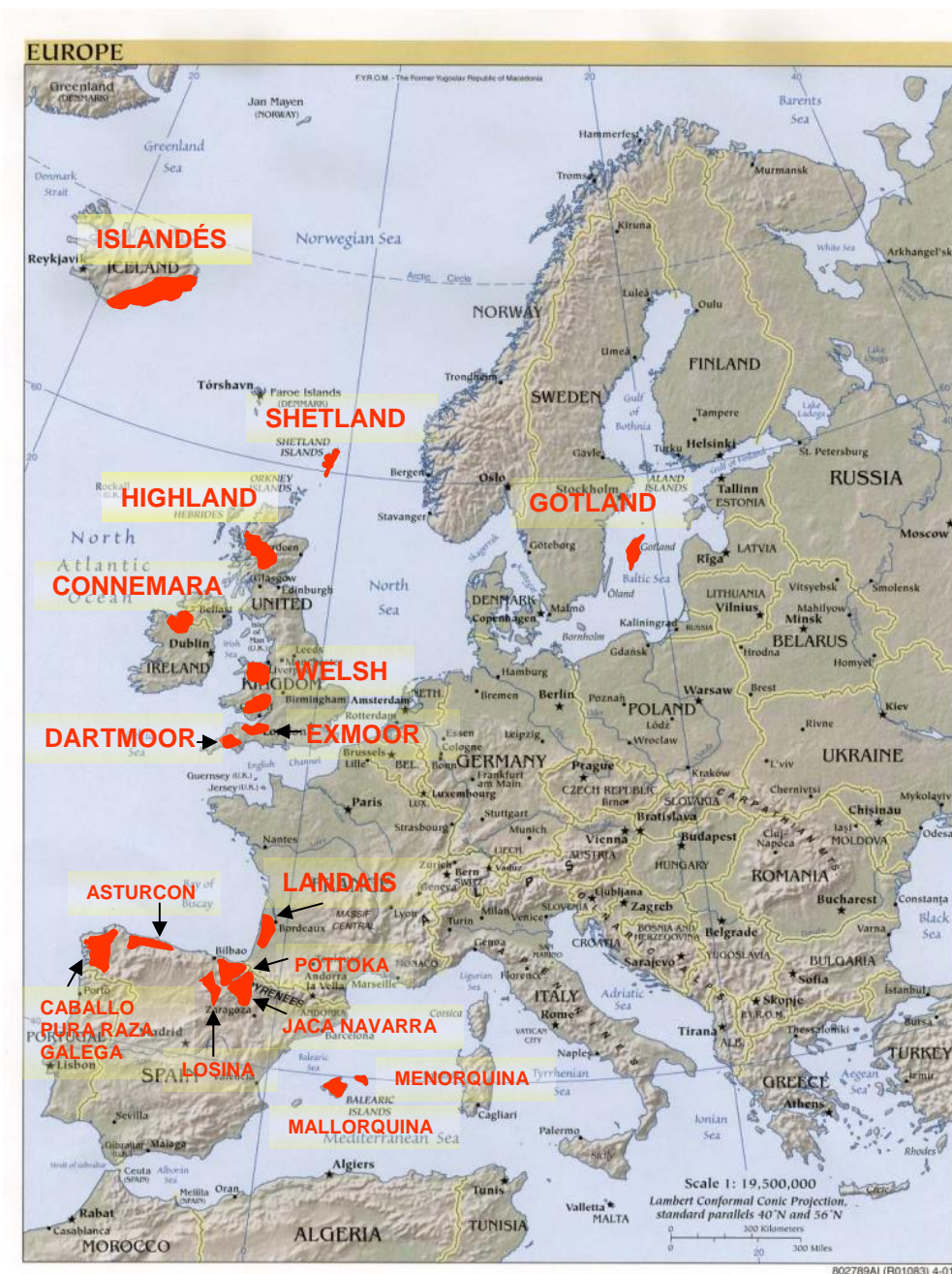
#### II.7.9. RAZA LANDAIS.

Se localiza en la costa suroccidental francesa, en una zona conocida como "Las Landas". Su morfología es totalmente coincidente con lo ya descrito, perfil subcóncavo, con frente amplia y ollares destacados, además de mandíbula potente. Su alzada no debe superar los 145 cm. La capa presenta gran variedad de coloraciones, siendo comunes los bayos y más raros los alazanes y negros.



**Figura 2.18.:** Raza Landais.





**Figura 2.19.:** Mapa con la distribución geográfica de las razas europeas de caballos de pequeña alzada de origen celta.

## II.8. Diversidad genética.

Uno de los objetivos principales de la genética de poblaciones es cuantificar la variabilidad genética existente, y explicar esta diversidad en términos de origen, mantenimiento e importancia evolutiva. La probabilidad de supervivencia de las poblaciones a largo plazo está relacionada con la variabilidad genética que poseen,



siendo un elemento fundamental en las estrategias de conservación el mantenimiento de la misma.

Cuando se estudia más de una población de animales, la diversidad genética se puede clasificar en dos componentes: variabilidad genética entre poblaciones, y variabilidad genética entre los individuos de una población. Estos dos componentes de la diversidad pueden ser estimados mediante el cálculo de numerosos estadísticos que tienen en algunos casos como fuente fundamental de información, la distribución de las frecuencias alélicas de los marcadores genéticos empleados. La idea de frecuencia alélica soporta en sí misma la noción de polimorfismo y un gen se considera arbitrariamente como polimórfico desde el momento en que el alelo más común tiene una frecuencia inferior a 0,95.

Para conocer las frecuencias alélicas de un gen es necesario evidenciar de algún modo sus alelos y en este sentido se han desarrollado en los últimos años numerosas técnicas en el campo de la biología molecular encaminadas a encontrar marcadores genéticos que aporten la mayor cantidad de información posible respecto a la estructura genética de las poblaciones y su historia evolutiva.

#### II.8.1. Marcadores genéticos

Un marcador molecular se corresponde con una región del ADN que debido a su polimorfismo y los mecanismos de la herencia permite seguir el rastro de un gen a través de las generaciones. Los marcadores pueden ser de naturaleza muy diversa y presentar numerosas diferencias entre ellos, tanto en el método de detección como en las tasas de mutación, mecanismos de expresión, polimorfismo, etc. Estas diferentes características son las que les hacen ser más o menos útiles según el objetivo del trabajo a desarrollar.

Antes de comenzar a describir los marcadores genéticos más utilizados en el campo de la genética de poblaciones, es necesario destacar que en el desarrollo de muchos de ellos ha cumplido un papel esencial el descubrimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Saiki y col., 1985; Mullis y col., 1986), consistente básicamente en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN, flanqueado por dos oligonucleótidos cebadores que hibridan en las dos cadenas alternativas de la secuencia doble de ADN. Mediante ciclos repetidos que incluyen tres pasos claves: desnaturalización (para separar la doble hebra y que los cebadores tengan

acceso a las zonas complementarias), hibridación (los cebadores se unen a sus zonas complementarias) y extensión (la polimerasa se ancla a los cebadores y comienza a crear una copia complementaria de cada una de las hebras), es posible obtener millones de copias de una secuencia de ADN en tan sólo unas horas y de forma automatizada.

II.8.1.a. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms o Fragmentos de Restricción de Longitud Variable) (Quinn y White, 1987).

Este tipo de marcador se basa en la posibilidad de que las variaciones nucleotídicas existentes a nivel de la secuencia de ADN coincidan con las secuencias diana que reconocen las enzimas de restricción, las cuales tienen la capacidad de cortar el ADN a ese nivel. Los fragmentos obtenidos tras el corte se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa.

Estos marcadores pueden combinarse con otras técnicas como la hibridación (Southern, 1975), de modo que los fragmentos se transfieren a una membrana y sobre ella se deposita una sonda específica. Los lugares en los que la sonda se ha unido a los fragmentos se visualizan posteriormente por medio de diferentes marcajes (isotópico o enzimático) con lo que se obtiene un patrón de bandas característico de cada individuo.

Otra posibilidad consiste en combinarla con la técnica de PCR, situando una pareja de cebadores flanqueando la zona que contiene la mutación que es diana para las enzimas de restricción, y se amplifica el número suficiente de veces que permita su visualización tras la electroforesis en un gel de agarosa o poliacrilamida.

Este marcador presenta ciertos inconvenientes. Se trata de una técnica costosa que al incluir la hibridación resulta imposible de automatizar y tiene unos requerimientos de cantidad de ADN muy elevados. Además se trata de marcadores dominantes, y por tanto no es posible distinguir animales homocigotos de heterocigotos.

Su aplicación práctica más importante hoy en día consiste en utilizarla como herramienta de diagnóstico de mutaciones que provocan cambios fenotípicos, que pueden tener implicaciones sanitarias y/o económicas importantes (Meyer y col., 1995; Emile y col., 2002; Geysen y col., 2003)

II.8.1.b. RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA o Polimorfismos de ADN amplificados de forma aleatoria) (Welsh y McClelland, 1990)(Williams y col., 1990).

Estos marcadores se basan en la técnica de la PCR, con la característica especial de que solo se utiliza un cebador de un tamaño reducido de 10 nucleótidos (Parker y col., 1991), el cual se va a unir a las zonas del ADN en las que encuentre complementariedad, sin que exista un conocimiento previo de cuales son estas zonas. Para favorecer la unión del cebador con el ADN se utilizan condiciones de hibridación muy laxas, pequeño tamaño del cebador y bajas temperaturas de hibridación. El producto amplificado se visualiza en geles de agarosa o poliacrilamida y lo que se observa es un patrón de bandas característico en el que tanto la presencia como la ausencia de una banda son informativas.

La principal ventaja de este marcador es que no es necesario un conocimiento previo del genoma a amplificar, situación en la que se encuentran numerosas especies silvestres, y con ellos se pueden detectar mutaciones que afecten a una sola base y que impiden la correcta unión del cebador al ADN y por tanto ocasionan que un determinado fragmento no se amplifique.

Estos marcadores se utilizan en numerosas ocasiones sobre mezclas de ADN de diferentes individuos pertenecientes a diversas poblaciones o razas, con lo que se pretende encontrar diferencias entre poblaciones o razas y no a nivel individual (Smith y col., 1996; Wei y col., 1997; Loughheed y col., 2000; Sharma y col., 2001). Una vez que se han detectado bandas específicas de población o raza, éstas pueden ser clonadas y secuenciadas o utilizarse posteriormente como sonda específica.

Sin embargo, también poseen numerosos inconvenientes: escasa repetibilidad en los resultados cuando las condiciones de amplificación no se mantienen estrictamente, lo que les hace difícil de transferir de un laboratorio a otro; y son marcadores dominantes, con lo que no se pueden distinguir animales homocigotos de heterocigotos.

II.8.1.c. AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) (Vos y col., 1995).

Esta técnica está basada en la detección de fragmentos de restricción amplificados por PCR que permite trabajar con cualquier tipo de ADN porque no requiere un conocimiento previo de la secuencia. El ADN se corta con enzimas de

restricción y se ligan unos adaptadores de doble hebra a los extremos de cada fragmento para generar los moldes de ADN que serán objeto de amplificación. La secuencia de los adaptadores y del lugar de restricción, sirven como lugar de anclaje del cebador que tendrá una secuencia complementaria a los mismos. Se incluyen nucleótidos selectivos al extremo 3' de los cebadores, de modo que solo se amplificarán los fragmentos que tengan junto al sitio de restricción, los nucleótidos complementarios a los del cebador. Para generar los fragmentos de restricción se usan dos enzimas distintas, una de corte frecuente y otra de corte poco frecuente. El genoma de cada individuo va a dar lugar a fragmentos amplificados de distinto tamaño dependiendo de la presencia o no de la diana de restricción. La observación de los distintos fragmentos se realiza en geles de poliacrilamida y posterior tinción con plata, o mediante radiactividad, y también mediante fluorimetría en secuenciadores automáticos.

#### II.8.1.d. VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats).

A lo largo del genoma existe un tipo ADN no codificante cuya estructura responde a secuencias de nucleótidos repetidos en tandem con una complejidad que puede variar entre 1pb y más de 2000 pb, hasta alcanzar una tamaño final entre 100 pb y  $100 \times 10^6$  pb (Tautz, 1989). En función de la longitud de la repetición y el tamaño de la estructura, estas secuencias repetidas en tándem se han dividido en dos clases: mini- y microsatélites.

##### II.8.1.d.1. MINISATÉLITES.

En el caso de los minisatélites (Jeffreys y col., 1985) el tamaño de la unidad repetida, conocida como secuencia "core" o central, tiene una longitud entre 10 y 100 pb. Los minisatélites se encuentran localizados en las porciones eucromáticas de los cromosomas y predominantemente en las regiones subteloméricas (Royle y col., 1988). El significado de los minisatélites no se conoce claramente pero se ha detectado que actúan como puntos calientes para la recombinación homóloga.

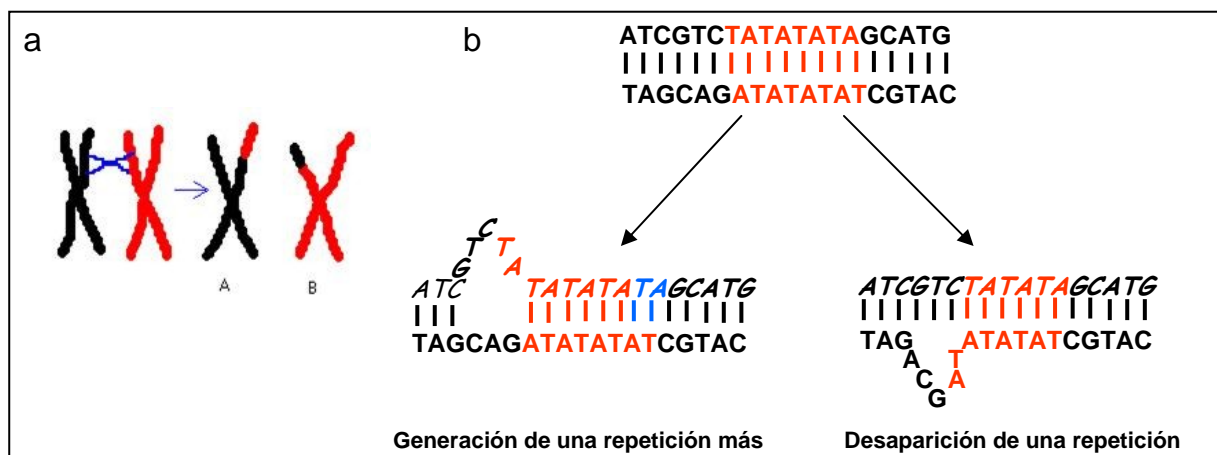
Georges y col. (1988) fueron los primeros que utilizaron los minisatélites en el caballo, además de en un amplio espectro de animales domésticos, usando cuatro sondas de diferentes minisatélites sobre una familia de caballos belgas. Los resultados demostraron que estas sondas eran altamente efectivas para distinguir

individuos, con una probabilidad de  $3,2 \cdot 10^{-12}$  de encontrar dos individuos con el mismo patrón.

#### II.8.1.d.2. MICROSATÉLITES.

El motivo repetido de los microsatélites varía entre 1 y 6 bases, y el número de repeticiones alcanza un máximo de 60.

Existen dos teorías que explican el origen de la variabilidad en el número de repeticiones, la primera lo justifica por un sobrecruzamiento desigual durante la meiosis que da lugar a cambios más bruscos en el número de repeticiones (Figura 2.20. a) y la segunda mediante un mecanismo conocido como deslizamiento de la polimerasa durante la replicación (Figura 2.20. b) (Levinson y Gutman, 1987), siendo ésta la teoría más aceptada.



**Figura 2.20.:** a) Representación esquemática de un sobrecruzamiento desigual de los cromosomas A y B, b) Fenómeno de deslizamiento de la polimerasa: generación y desaparición de una repetición por formación de un bucle en la hebra sintetizada de nuevo (cursiva) o en la hebra molde, respectivamente.

El fenómeno de deslizamiento de la polimerasa consiste en que durante el proceso de generación de la hebra complementaria, se pueden formar bucles que si se originan en la hebra que actúa de muestra, darían lugar a una repetición menos en las copias, mientras que si se forman en la hebra que se está generando darían lugar a copias con una repetición más (Schlotterer y Tautz, 1992). Experimentos *in vitro* han demostrado que el deslizamiento de la polimerasa ocurre con una frecuencia muy elevada (Hentschel, 1982; Streisinger y Owen, 1985; Schlotterer y Tautz, 1992). La

discrepancia entre el grado mutacional observado *in vitro* y el observado *in vivo*, se explica por la presencia de un sistema reparador de errores, que reduce el grado mutacional entre 100 y 1000 veces (Strand y col., 1993). Varios trabajos relacionan la inestabilidad de los microsatélites a un sistema reparador defectuoso en algunos cánceres humanos (Aquilina y Bignami, 2001; Atkin, 2001, Hussein y Wood, 2002).

Los primeros microsatélites de caballo fueron caracterizados por Ellegren y col. (1992) y Marklund y col. (1994), quienes aislaron repeticiones CA/GT y demostraron que eran altamente polimórficos en caballos, utilizándose para análisis de parentesco y estudios de ligamiento. Una probabilidad combinada de exclusión de paternidad basada en ocho de estos microsatélites dio un valor de 0,96-0,99.

#### *II.8.1.d.2.1. Localización de los microsatélites a lo largo del genoma.*

Los microsatélites se localizan preferentemente en regiones no codificantes del genoma, y de forma relativamente rara en regiones codificantes de proteínas. Por ejemplo, en el caso de los 101 microsatélites mono-, di- y tetranucleótidos descritos por Wang y col., 1994, todos ellos fueron localizados en regiones no codificantes de 54 especies diferentes de plantas. Todos los tipos de microsatélites, desde los mono- a los hexanucleótidos, fueron encontrados en exceso en regiones no codificantes de seis clados de eucariotas diferentes: *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Mus*, *Drosophila*, plantas y primates, comparado a una aparición aleatoria (Metzgar y col., 2000). Sin embargo esta situación es diferente en el caso de las repeticiones en tripletes asociadas a enfermedades, que son más frecuentes en regiones codificantes del genoma humano (Nadir y col., 1996). Estos tripletes cuando son muy largos no son conservados durante períodos muy largos de tiempo, aún cuando se encuentran situados en zonas codificantes, debido a desestabilizaciones durante la meiosis (Jankowski y col., 2000).

La mayoría de los microsatélites encontrados en numerosas especies son dinucleótidos (Wang y col., 1994; Schug y col., 1998), excepto en primates donde son mononucleótidos (principalmente poliA/T) (Tóth y col., 2000; Wren y col., 2000).

La presencia de secuencias de tipo microsatélite se ha observado en el 14% de las proteínas, con una abundancia tres veces mayor en eucariotas que procariotas (Marcotte y col., 1999). Estos microsatélites están situados en proteínas no homólogas, lo que podría indicar que los microsatélites surgieron después de que

estos dos reinos se separasen. El hecho de que los eucariotas tengan más microsatélites podría indicar una ventaja evolutiva que supone mayor adaptación a los nuevos ambientes (Marcotte y col., 1999).

La evidencia empírica parece indicar que los microsatélites son más abundantes y más largos en vertebrados que en invertebrados, y dentro de los vertebrados más largos en las especies de sangre fría (Chambers y MacAvoy 2000).

Respecto al tipo de repetición también existen diferencias entre unas especies y otras. En el caso de mamíferos y *Drosophila* la repetición GT es la más abundante, en *Arabidopsis thaliana* y en levaduras la AT, y en *Caenorhabditis elegans* la GA, que es la menos frecuente en las especies anteriores. Una explicación a este hecho reside en que el sistema reparador de errores presenta una eficiencia diferente dependiendo del tipo de error y de la especie (Modrich y Lahue, 1996; Marra y Schär, 1999).

La distribución de los microsatélites varía no sólo entre especies, sino también dentro de cromosomas del mismo organismo. Las regiones centroméricas suelen presentar una frecuencia menor de microsatélites (Pardue y col., 1987; Lowenhaupt y col., 1989), y a una escala más fina se observa que los microsatélites tienden a formar clusters, lo que ocasiona una distribución no aleatoria en secuencias tan cortas como 15 kb (Bachtrog y col., 1999).

#### *II.8.1.d.2.2. Importancia funcional de los microsatélites.*

Aunque la mayor parte de los microsatélites son marcadores de ADN evolutivamente neutros, una parte presentan un significado funcional que se ha probado en varios fenómenos biológicos, como son:

##### a) La organización de la cromatina:

a1) Microsatélites que afectan a la organización cromosómica: el hecho de que ciertos microsatélites se encuentren conservados ocupando la misma posición cromosómica, independientemente del motivo repetido, entre especies cercanas (Cuadrado y Schawarzacher, 1998), podría sugerir una posible función de estabilización cromosómica.

a2) Microsatélites que afectan a la estructura del ADN: las secuencias repetidas de los microsatélites pueden dar lugar a una alta variedad de estructuras secundarias

que ofrecen un mecanismo de desenrollamiento que puede ser ventajoso durante la transcripción, proporcionando motivos de reconocimiento proteico únicos (Cataste y col., 1999)

a3) Microsatélites localizados en el centrómero y telómero: en muchas especies la región centromérica de los cromosomas está compuesta de numerosos microsatélites, que afectan a su organización. La ubicuidad de estos microsatélites entre diversas especies sugiere un fuerte ligamiento evolutivo entre esta estructura centromérica y su función (Eichler, 1999)

b) La regulación de los procesos metabólicos

b1) Microsatélites que afectan a la recombinación: Se han propuesto numerosos microsatélites y minisatélites como puntos calientes de recombinación (Jeffreys y col., 1998; Templeton y col., 2000). Las repeticiones GT, CA, CT, GA, GC o AT, se unen a proteínas que podrían participar en el proceso de recombinación por inducir la conformación Z u otra estructura secundaria alternativa (Korol y col., 1994; Karlin y col., 1998; Biet y col., 1999).

b2) Microsatélites que afectan a la replicación del ADN y ciclo celular: los microsatélites pueden afectar a enzimas que controlan el ciclo celular. El gen *CHK1* posee en su región codificante una repetición (A)<sub>9</sub> (Codegoni y col., 1999) que es un sitio puntual de mutaciones en tumores debidos a la inestabilidad de los microsatélites. La inserción o la delección de una Adenina da lugar a una proteína trunca. Algunos genes que controlan el ciclo celular, tales como *hMSH3*, *hMSH6*, *BAX*, *IGFiir*, *TGFbetaIIIR*, *E2F4* y *BRCA2*, pueden ser portadores de microsatélites. También se ha encontrado repeticiones largas (CAG)<sub>n</sub> en células espermáticas de machos con ataxia espinocerebelosa tipo 7, en las que una proporción importante de dichos alelos podrían estar asociados con letalidad embrionaria o espermatozoides afuncionales (Monckton y col., 1999)

b3) Los microsatélites en el gen *DNA-MMR* eucariota como moduladores del grado de mutación evolutiva: Las proteínas *DNA-MMR* corrigen los errores de replicación e inhiben activamente la recombinación entre secuencias que han divergido (Chen y Links-Robertson, 1998; Kolodner y Marsischky, 1999), controlando de este modo los niveles de mutación y la adaptación evolutiva.



c) La regulación de la actividad genética

c1) Los microsatélites y la transcripción: Existen numerosas evidencias que muestran que microsatélites localizados en las regiones promotoras pueden afectar la actividad genética. Por ejemplo, la actividad transcripcional del promotor decreció drásticamente debido a la delección de un tramo (TCCC) en el promotor del gen *c-KI-ras* (Hoffman y col., 1990).

Los microsatélites situados en los intrones también pueden afectar a la transcripción. Por ejemplo, un microsatélite tetra- (*HUMTH01*) situado en el primer intron del gen tirosina-hidroxilasa actúa como elemento regulador de la transcripción (Meloni y col., 1998).

Es sabido que los microsatélites tri- se sitúan preferentemente en genes reguladores relacionados con la transcripción y la señal de traducción, y menos frecuentemente en genes que codifican para proteínas estructurales (Young y col., 2000).

c2) Efecto del número de repeticiones de los microsatélites sobre la expresión génica: algunos genes pueden expresarse sólo bajo un número específico de repeticiones de los microsatélites. Por ejemplo, en la zona promotora del gen *lac Z* de *Escherichia coli*, sólo la repetición (GAA)<sub>12</sub> permite su expresión, mientras que (GAA)<sub>14-16</sub> o (GAA)<sub>5-11</sub> no permiten que este gen se exprese (Liu y col., 2000).

c3) Adhesión de proteínas: algunos microsatélites sirven como sitios de adhesión de proteínas reguladoras (Lue y col., 1989; Csink y Henikoff, 1998). Por ejemplo, el gen *datin* se une a tramos de poli(T) de 19, 15 y 11 pb de longitud, con similar afinidad, pero no se pega cuando la longitud es de 3, 5, 7 u 8 pb (Winter y Varshavsky, 1989)

c4) Asociación de los microsatélites con cánceres humanos y desórdenes genéticos: aproximadamente el 15% de los cánceres colo-rectales, así como otros tipos de cánceres, muestran inestabilidad de los microsatélites (Atquin, 2001). La progresiva acumulación de inestabilidad en los microsatélites puede también contribuir al desarrollo de cánceres gástricos (Leung y col., 2000)

*II.8.1.d.2.3. Razones que justifican el uso de los microsatélites como marcador ideal para el análisis genético de poblaciones.*

Los microsatélites presentan una serie de características que les confieren un grado de preferencia frente a otros marcadores:

- a) Se trata de unas secuencias que se encuentran en un número alto a lo largo del genoma y repartidas de forma más o menos homogénea, una cada 10 ó 20 kb (Edwards y col., 1991, Edwardsy col., 1992; Bowcock y col, 1994; Forbes y col., 1995)
- b) La mayoría tienen un efecto neutro frente a la selección.
- c) Son fácilmente amplificables a través de la PCR, incluso cuando se parte de muestras biológicas escasas o muy degradadas.
- d) El resultado de la amplificación es visible mediante geles de poliacrilamida o mediante secuenciadores automáticos, y la caracterización en pares de bases de los alelos es sencilla, de modo que los resultados entre laboratorios son fácilmente intercambiables.
- e) Poseen un elevado polimorfismo como consecuencia de una mayor tasa de mutación ( $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ ) (Edwards y col., 1992; Bowcock y col., 1994; Forbes y col., 1995). Esta característica les hace especialmente deseables en el caso de poblaciones donde el nivel de endogamia es alto, o para diferenciar poblaciones estrechamente relacionadas.
- f) Se encuentran bastante conservados desde el punto de vista evolutivo de modo que unos microsatélites descubiertos en una especie pueden ser amplificados con éxito en otra especie del mismo género, aunque el nivel de polimorfismo encontrado no sea el mismo.
- g) Son marcadores codominantes.
- h) La metodología laboratorial necesaria para su estudio es sencilla, rápida y de bajo coste económico.

Todas estas ventajas han determinado que actualmente sea el tipo de marcador ideal para numerosos estudios genéticos, mapeo genético (Weissenbach y col., 1992),

análisis de ligamiento (Bailey y col., 1997), análisis de filiación (Edwards y col., 1992), análisis genético de poblaciones (Bruford y Wayne, 1993), etc.

#### *II.8.1.d.2.4. Aplicaciones de los microsatélites.*

a) *Mapas genéticos.* Los mapas genéticos son una herramienta muy importante para poder determinar la localización de genes que sean de interés.

Desde el punto de vista de la producción animal, los genes más interesantes son los responsables de caracteres de interés productivo (QTLs), y desde el punto de vista de la sanidad animal, los responsables de ciertas patologías

Una forma de abordar el estudio de este tipo de genes consiste en encontrar alelos que se cohereden con el gen o genes responsables del fenotipo de interés. De acuerdo con los principios mendelianos, cuando un alelo marcador y el alelo del gen de interés están muy separados dentro del mismo cromosoma o están en cromosomas diferentes, éstos segregarán de forma independiente, y el alelo marcador podrá aparecer con igual frecuencia en individuos con fenotipos opuestos. Sin embargo, si el alelo marcador se encuentra próximo al alelo del gen responsable, dentro del mismo cromosoma, el marcador y el gen segregarán conjuntamente, proporcionando una evidencia del ligamiento existente.

Los mapas de ligamiento meiótico o mapas genéticos están constituidos por loci, para los que la distancia genética entre marcadores adyacentes está determinada en centiMorgans (cM). El método de elaboración de estos mapas consiste en trazar la herencia de los alelos y la posición de los eventos de recombinación a través de pedigrís compuestos por varias generaciones. Como los cromosomas sufren numerosas recombinaciones durante la meiosis, los marcadores o genes localizados lejos en el mismo cromosoma, se disociarán durante la espermatogénesis u oogénesis, y de este modo se dice que no están ligados. Los marcadores o genes que se localizan próximos físicamente sobre el mismo cromosoma, tienen una posibilidad más baja de separarse durante la meiosis, y se dice que están ligados. Para una región concreta del genoma, la probabilidad de que ocurra recombinación entre dos loci cualquiera, es directamente proporcional a la distancia entre ellos, y se expresa como la fracción de recombinación ( $\theta$ ). Un 1% de recombinación es aproximadamente igual

a 1 cM, lo que groseramente corresponde a un millón de pares de bases en la especie humana y un poco más de dos millones en ratón.

La construcción de los mapas genéticos tiene lugar en varios pasos. En primer lugar se aíslan numerosos marcadores, a continuación, estos marcadores se localizan dentro de grupos de ligamiento (los marcadores que se localizan en el mismo grupo de ligamiento pertenecen al mismo cromosoma), y finalmente se determina el orden de estos marcadores dentro de cada cromosoma. La distancia genética entre dos marcadores es el número esperado de sobrecruzamientos que ocurren entre ambos en un solo cromosoma durante la meiosis. El proceso por el que se cuenta el número de descendientes recombinantes y no recombinantes en un cruce, seguido de la estimación de la distancia en el mapa y la verosimilitud del ligamiento frente al no ligamiento para un par de marcadores, se denomina “análisis de ligamiento genético”. El paquete de alelos, representado por varios marcadores continuos, que son recibidos por un individuo desde un padre concreto, se conoce como haplotipo. Cuanto más largo es el pedigrí, más útil resulta para la construcción del mapa genético, siendo necesarias como mínima tres generaciones.

Los mapas genéticos están compuestos de marcadores ordenados linealmente, con una posición asignada a lo largo de los cromosomas por medio de mapeo genético o físico. Los marcadores que componen los mapas genéticos son de dos tipos (O'Brien, 1991), marcadores tipo I, que son genes con función conocida, útiles para el desarrollo de mapas comparativos, y marcadores tipo II, que son marcadores polimórficos anónimos, entendiendo como tales, aquellos en los que el alelo más común, tiene una frecuencia inferior al 95%. Dentro de los marcadores tipo II, inicialmente se comenzó utilizando marcadores de tipo RFLP (Donis-Keller y col., 1987), pero con el tiempo fueron reemplazados por los microsatélites, que demostraron poseer unas características muy interesantes para este propósito: herencia mendeliana, distribución homogénea y frecuente a lo largo del genoma, elevado polimorfismo (alto número de alelos por locus), lo que conlleva un nivel de heterocigosis más alto y permite reducir el número de familias de referencia necesarias para construir el mapa. Además, los microsatélites, gracias al descubrimiento de la PCR y a la implementación de técnicas de genotipado masivo, han posibilitado reducir costes y acelerar la obtención de resultados.

b) *Medicina forense*: el estudio del ADN con propósitos forenses fue empleado por primera vez en 1986 en Inglaterra con el objetivo de exonerar a un ciudadano que había sido falsamente acusado de la violación y asesinato de dos jóvenes.

Desde ese momento se han desarrollado numerosas metodologías encaminadas a incrementar la especificidad de la técnica, su sensibilidad y su poder de discriminación. Los microsatélites y el ADN mitocondrial son los dos principales marcadores genéticos empleados con este fin, y dependiendo de las circunstancias la elección recaerá en uno u otro.

Los microsatélites presentan la ventaja de poseer un elevado polimorfismo, lo que conlleva una potencia de discriminación más alta que la obtenida al analizar el ADN mitocondrial. Este hecho es especialmente importante cuando se pretende discriminar individuos que pueden estar emparentados (Padar y col., 2001). En caso de que el objetivo del trabajo no sea diferenciar a nivel individual, es posible recurrir al análisis del ADN mitocondrial, con el que es posible diferenciar variedades, razas o especies (Poetsch y col., 2001; Branicki y col., 2003).

Cuando se trata de analizar el material biológico procedente de animales, en muchas ocasiones tan sólo se cuenta con pelos de los individuos implicados, y aunque es posible el análisis de algunos marcadores nucleares, lo cierto es que resulta más exitoso analizar el ADN mitocondrial ya que el número de copias por célula es mayor que del ADN genómico (Savolainen y Lundeberg, 1999). Sin embargo los microsatélites, pueden ser amplificados y resueltos en secuenciadores automáticos, incluso cuando se parte de ADN muy degradado o en cantidades muy bajas, gracias al incremento en la sensibilidad de esta técnica.

c) *Control de genealogías*: en multitud ocasiones el valor genético y comercial de un animal está asociado a su pedigrí, y por tanto la identificación individual y de los ancestros de un individuo por medio de metodologías seguras es un paso clave cuando se quieren ofrecer garantías de parentesco.

Históricamente la identificación individual se había llevado a cabo, en primer lugar, mediante la identificación morfológica, basándose en el fenotipo del animal, o por medio del marcado de los animales, haciendo uso de tatuajes o crotales. Posteriormente se comenzaron a usar las proteínas y grupos sanguíneos, que además de permitir la identificación individual, posibilitaban establecer controles de

parentesco con un notable poder de discriminación, pero adolecían de bastantes desventajas en relación a los nuevos tipos de marcadores que surgieron posteriormente, basados en el ADN.

De estos nuevos marcadores basados en el ADN los que se han utilizado más ampliamente han sido los microsatélites (Zajc y col., 1994, Vankan y Faddy, 1999), debido a diversas razones:

- Comparados con las pruebas serológicas, los microsatélites necesitan de cantidades mucho más pequeñas de material biológico a partir de las que extraer el ADN. Además es posible obtener estas muestras incluso de animales que ya han fallecido, y a partir de muy variados tejidos.

Estas necesidades de ADN también son menores cuando son comparados con otros marcadores genéticos, como los RFLPs, que también se han utilizado con este fin, especialmente en aquellas especies donde no se habían descrito microsatélites.

- Son marcadores codominantes con herencia mendeliana, lo que posibilita identificar claramente los alelos presentes en el descendiente procedentes de ambos parentales.
- Su resolución se lleva a cabo por medio de metodologías fácilmente estandarizables y automatizables con una mayor reproducibilidad en los resultados, y la posibilidad de que estos sean intercambiables entre laboratorios, en contraposición a los RAPDs.
- Se puede realizar el análisis de varios marcadores en una sola reacción de PCR (multiplex), reduciendo de este modo los costes económicos y agilizando la obtención de resultados.
- Se trata de marcadores altamente polimórficos, y por tanto con un elevado poder de discriminación entre individuos. Esta capacidad de discriminación está relacionada con la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de la población de referencia tengan un mismo genotipo. Se recomienda trabajar con valores entre  $10^{-5}$  y  $10^{-14}$ , dependiendo del tamaño de la población a estudiar. Estos valores de discriminación pueden ser logrados por un conjunto variable, entre 8 y

15 marcadores del tipo microsatélite, según la población de referencia (por ejemplo de la raza de que se trate) y el polimorfismo del conjunto de marcadores que se está analizando.

La potencia de exclusión, es decir, el porcentaje de falsos padres detectados como tales, depende de la capacidad de discriminación del conjunto de marcadores utilizado, de modo que si utilizamos un conjunto de entre 8 y 15 marcadores es posible alcanzar valores superiores al 99%, lo que indicaría que de cada 100 falsos padres sólo en un caso lo daríamos como si fuera compatible, es decir, un falso padre asignado como verdadero.

En la actualidad existe un organismo internacional, *The International Society for Animal Genetics (ISAG)*, que desde 1992 alberga el Test Internacional de Genotipado Comparativo Equino usando otros marcadores, al margen del que se desarrolla usando grupos sanguíneos. Por medio de este test internacional, se pretende consensuar los resultados obtenidos en diversos laboratorios y ratificar la validez de unos microsatélites frente a otros.

d) *Trazabilidad*: el término de trazabilidad o rastreabilidad aplicado a la industria alimentaria puede definirse como *“la posibilidad de encontrar y seguir el rastro a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución de un alimento, de un pienso, de un animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia destinados a ser incorporados en alimentos humanos o con probabilidad de serlo”*.

Aunque la trazabilidad engloba más aspectos que la identificación genética individual, éste es un paso importante que debe cumplir tres características fundamentales: identificación permanente, única y de por vida.

El objetivo de los productores es conseguir en la identificación una solución que dure toda la vida del animal e incluso después de su sacrificio, que sea difícil de manipular de forma fraudulenta y que se pueda interconectar perfectamente con el sistema de manejo de la explotación y con los programas nacionales de identificación, así como que sea válido internacionalmente.

Por tanto, en el caso de que la trazabilidad conlleve una identificación individual, los microsatélites ofrecen las mismas ventajas, que las descritas en el apartado de control de genealogías. El objetivo es poder identificar en cualquiera de

los eslabones de la cadena alimentaria, explotación, industria y puntos de venta de qué animal procede, la canal que estamos procesando o el filete que compramos, comparando el perfil genético de la pieza con el obtenido en la explotación.

La trazabilidad también es importante en aquellos productos procesados que se originan a partir de la mezcla de diversos individuos, como puede ser el caso de embutidos, carnes picadas, pescados enlatados,... por lo que resulta imposible determinar de qué individuos procede el alimento. Esta situación es importante porque muchos productos adquieren un mayor o menor coste dependiendo de la raza de origen del animal de procedencia. La solución recae en el uso de marcadores como los microsatélites, utilizando métodos basados en la máxima verosimilitud de que el genotipo anónimo ocurra dentro de alguno de las razas probables (Bjornstad y Roed, 2002).

#### *II.8.1.d.2.5. Automatización del genotipado con microsatélites.*

Cuando se pretenden realizar estudios que conlleven el genotipado de un alto número de microsatélites y/o de individuos, es necesario recurrir a técnicas rápidas, seguras, sencillas y de bajo coste. Los métodos más habituales basados en la electroforesis de los productos amplificados han evolucionado desde el soporte en gel, hasta la electroforesis en capilar.

La electroforesis en geles, que pueden ser de agarosa o de acrilamida, también ofrece sus variantes. Por un lado está la electroforesis de productos amplificados con cebadores que no tienen ningún marcaje, y que después se resuelven con métodos como la tinción con nitrato de plata o bromuro de etidio. Utilizando esta técnica la resolución y sensibilidad de los geles de acrilamida es superior a los de agarosa, y se utilizan con mucha mayor frecuencia.

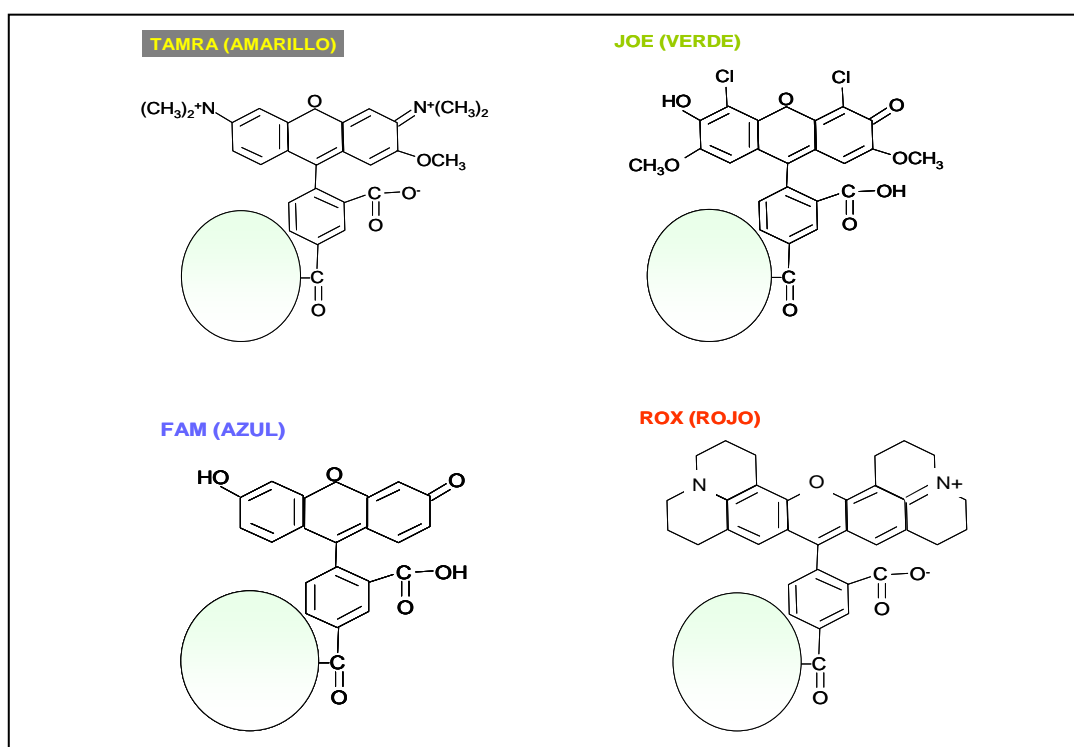
Esta es la opción más sencilla y con los costes más bajos, sin embargo también tiene sus inconvenientes. Se trata de una técnica más laboriosa, con mayor exigencia de mano de obra, y que ofrece una menor repetibilidad en los resultados. Además no es posible realizar multiplex de microsatélites cuyo producto de amplificación tenga el mismo tamaño, por solapamiento de las imágenes de los amplicones.

Otra alternativa basada en la electroforesis en geles de acrilamida, se basa en el uso de la radiactividad, bien mediante marcaje de uno de los cebadores o marcando



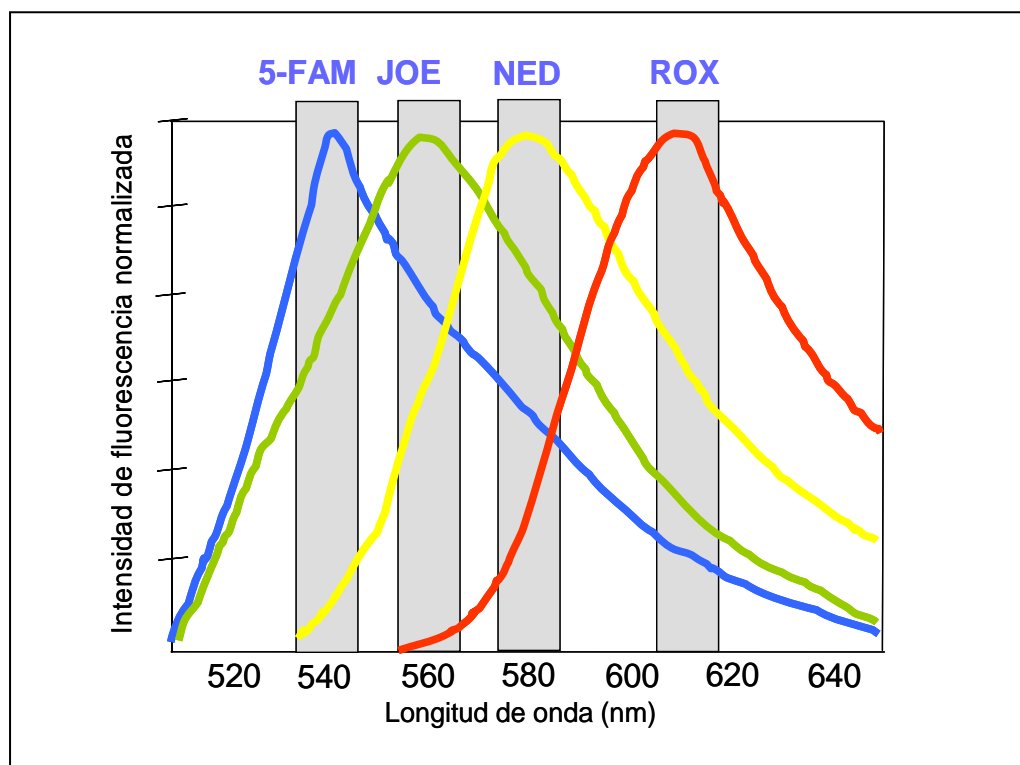
los dinucleótidos. Con respecto a la técnica anterior, presenta la única ventaja de una mayor sensibilidad, pero comparativamente a las dificultades de manejo que conlleva, hace que se haya abandonado casi completamente.

La otra alternativa, más reciente, basada en la electroforesis en geles de acrilamida, consiste en utilizar cebadores marcados con fluorocromos (Carrano y col., 1989; Mansfield, 1995). Los fluorocromos son unas moléculas que se unen al extremo 5' del cebador a través del espacio 6-carbono: molécula fluorescente-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-cebador, y de este modo aportan una etiqueta fluorescente al producto amplificado (Figura 2.21.).



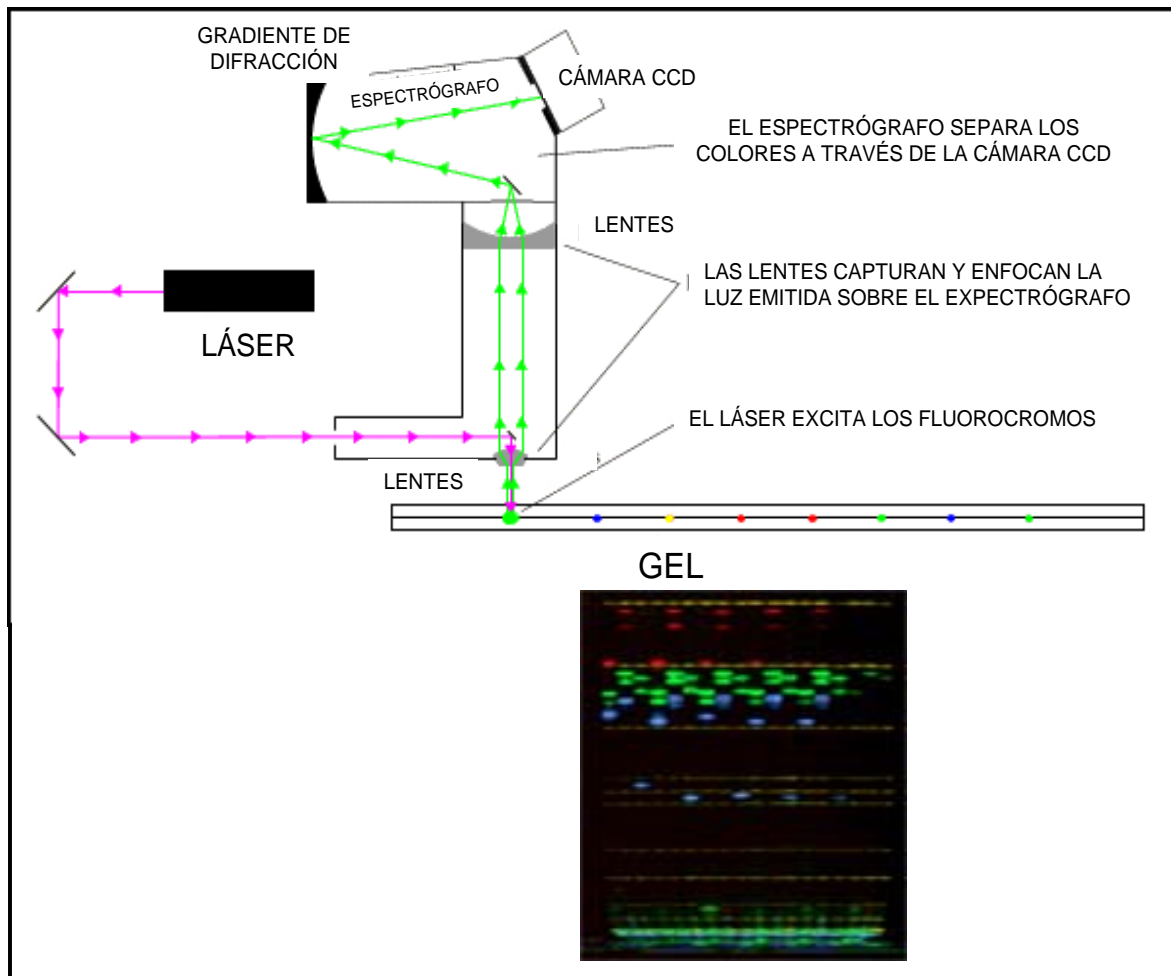
**Figura 2.21.:** Estructura de las moléculas fluorescentes denominadas FAM, JOE, TAMRA y ROX, empleadas en el marcado de cebadores y dideoxinucleótidos.

El espectro de emisión fluorescente de cada fluorocromo, presenta cierto solapamiento entre sí, por lo que se requiere una calibración inicial del aparato, que le permita posteriormente independizar las emisiones de cada fluorocromo (Figura 2.22.).



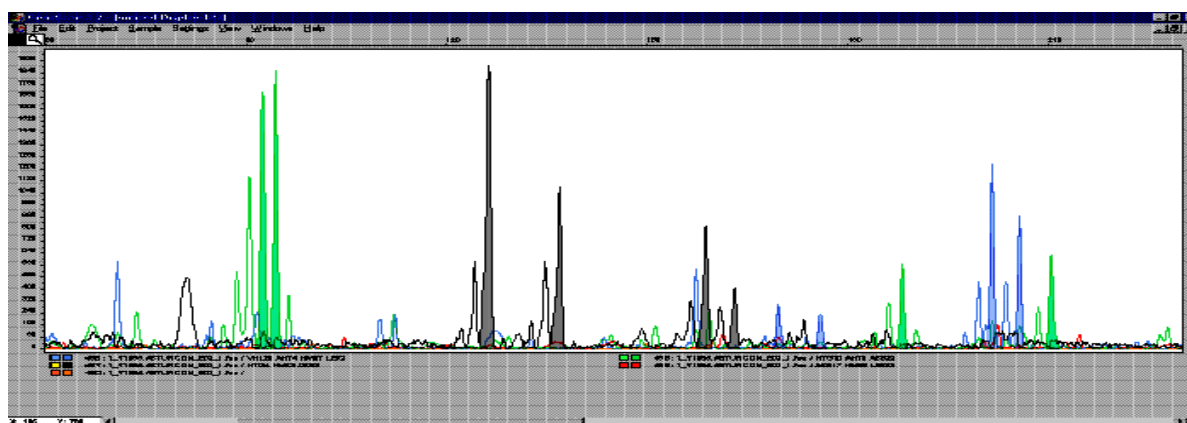
**Figura 2.22.:** Espectro de emisión de los fluorocromos 5-FAM, JOE, NED y ROX.

El primer paso de esta nueva técnica es similar a las anteriores, con la salvedad de que uno de los dos cebadores que interviene en la amplificación está marcado con una molécula fluorescente. Para poder visualizar esta amplificación es necesaria la intervención de unos aparatos conocidos como secuenciadores automáticos que presentan las siguientes particularidades. Al igual que en los casos anteriores, el producto amplificado es sometido a electroforesis en un gel de acrilamida, pero hacia la mitad inferior del gel una ventana permite que un láser emita un haz de luz a una frecuencia que excita al fluorocromo del producto amplificado provocando una emisión de onda que es recogida por una cámara fotográfica CCD que convierte la información fluorescente en información electrónica (Figura 2.23.).



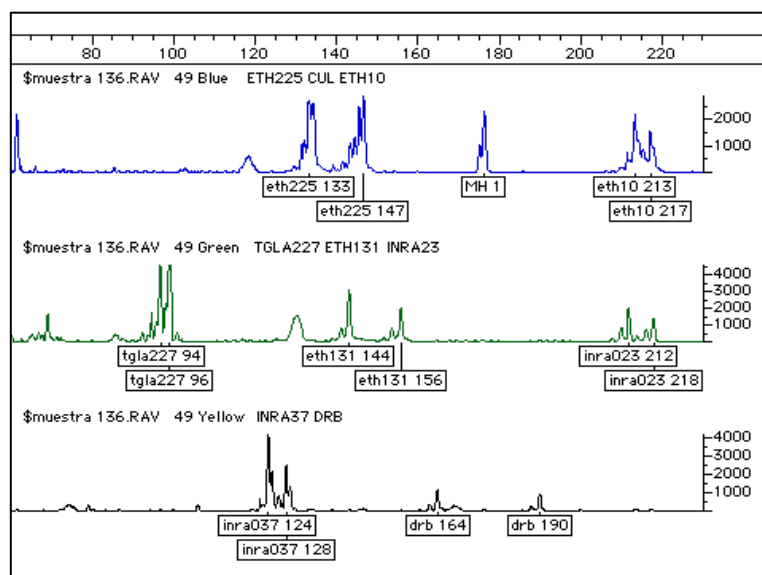
**Figura 2.23.:** Representación esquemática de la óptica de trabajo de un secuenciador automático con una imagen de la pantalla en tiempo real representativa de la electroforesis en un gel de poliacrilamida.

Esta información es transferida a un ordenador para su procesamiento y se muestra en forma de electroferograma, donde cada pico representa un fragmento. Los picos que aparecen tienen asignado un color diferente dependiendo del fluorocromo que lleven asociado, y además es posible conocer el tamaño en pares de bases de cada pico, su altura y su área, que van a ser reflejo de la cantidad de copias amplificadas (Figura 2.24.).



**Figura 2.24.:** Representación gráfica de la electroforesis en un secuenciador automático de un individuo con 7 microsatélites amplificados, cuyos alelos aparecen marcados en verde, negro y azul. Análisis realizado con el software GeneScan™ (AppliedBiosystems).

A pesar de que esta última técnica, presentaba notables ventajas sobre las anteriores: posibilidad de trabajar en multiplex con amplicones del mismo tamaño, mayor automatización del resultado al existir software específicos para interpretar los electroferogramas (Figura 2.25.), mayor sensibilidad en los resultados (necesidades menores de cantidad de producto amplificado), se han desarrollado nuevas herramientas aún más precisas.



**Figura 2.25.:** Representación gráfica de la electroforesis de un individuo amplificado con siete microsatélites, cuyos resultados han sido analizados por medio del software Genotyper™ (AppliedBiosystems). En la imagen aparecen los picos de amplificación de cada microsatélite, asociados a unas etiquetas con el nombre del microsatélite y del alelo amplificado.

Estas nuevas herramientas continúan basándose en la electroforesis del producto amplificado, pero ahora el soporte principal es a través de un capilar. Actualmente existen en el mercado diversos modelos, con aparatos que trabajan con un solo capilar, 4, 8, 16, 48 y hasta 96 capilares.

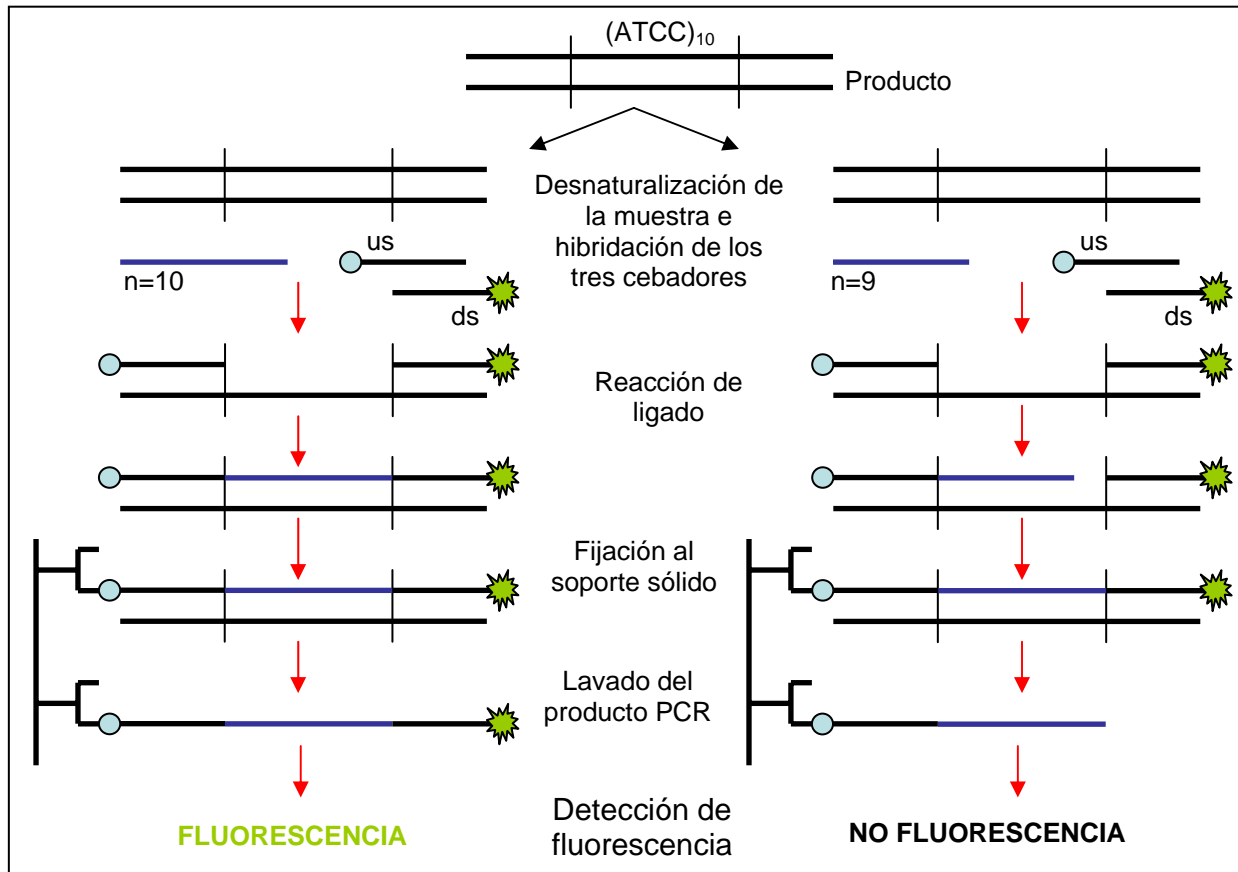
La filosofía de trabajo es la misma, la muestra es inyectada a través de un capilar relleno de polímero, y por él transcurre la electroforesis. Las diferencias principales con respecto a la electroforesis en gel, son una mayor automatización del proceso, con menos requerimientos de mano de obra, y además una mayor repetibilidad en los resultados con mayor sensibilidad de detección de los mismos. En su contra están unos costes económicos del genotipado más altos.

En la actualidad es posible trabajar con cinco fluorocromos simultáneamente, cuatro de los cuales se destinarán al marcaje de uno de los cebadores de cada microsatélite, y el restante queda para el marcador de tamaño interno de cada carrera, con el que poder predecir el tamaño de los productos amplificados, y comparar las carreras entre sí.

Además de estas, se han desarrollado otras metodologías de uso mucho menos frecuente. Es el caso de la técnica conocida como *LASA* (*ligate-assisted spacer addition*) (Brockhurst y col., 2001), basada en el uso de tres cebadores, dos de los cuales flanquean la región repetida, uno de ellos se unirá a un soporte sólido por su extremo 5' ("*us*"), y el otro posee en el extremo 3' un cromóforo ligado ("*ds*"), con el que poder después detectar fluorescencia. El tercer cebador es variable, posee la zona repetida un número variable de veces, y se va a ir añadiendo en diferentes reacciones. Una representación esquemática de la técnica aparece en la Figura 2.26..

Este método presenta la ventaja de que se pueden obtener resultados en muy poco tiempo (3 horas), y que al tratarse de una técnica con los mismos principios que el ELISA, es susceptible de automatización. Sus principales y notables desventajas son una puesta a punto muy laboriosa, ya que existen numerosos puntos críticos que pueden dar lugar a falsos positivos y negativos y además solo se van a testar las variantes alélicas conocidas, con lo que cuando se estudian por primera vez poblaciones no se van a considerar algunos alelos existentes, y en el caso de que se trate de microsatélites con repeticiones interrumpidas, no es posible su aplicación.

Por tanto su uso se destinaría únicamente al caso de poblaciones y microsatélites cuyo comportamiento está perfectamente descrito.



**Figura 2.26.:** Representación esquemática de la metodología LASA.

#### II.8.1.d.2.6. Modelización del proceso mutacional en microsatélites.

Durante los últimos años se han publicado numerosos estudios encaminados a la descripción de aproximaciones teóricas que puedan explicar el modelo evolutivo de los microsatélites.

Uno de los modelos posibles es el conocido como *SMM* (Stepwise Mutation Model, o modelo mutacional paso a paso) (Kimura y Ohta, 1978), el cual fue concebido inicialmente para explicar la regularidad en la distribución de las frecuencias alélicas, y asume que un alelo sólo puede mutar a sus dos estados adyacentes por pérdida o adición de una repetición. Diversos estudios realizados (Shriver y col., 1993), comparaban los valores observados de número de alelos, rango del tamaño de los alelos y modas en la distribución de los alelos, con los valores

obtenidos por simulación bajo el modelo SMM, y encontraron que los minisatélites y los microsátélites dinucleótidos se ajustaban peor a dicho modelo.

El modelo *TPM* (Two Phase Model) (Di Rienzo y col., 1994) y el *GSM* (Generalized Stepwise Model), se pueden considerar una variante del anterior. En el modelo *TPM*, los cambios alélicos se producen por adición o sustracción de un número absoluto de  $x$  unidades repetidas con igual probabilidad para un modelo mutacional simétrico.  $x$  es igual a 1 con probabilidad  $P_{SMM}$ , y con probabilidad  $1 - P_{SMM}$ ,  $x$  sigue una distribución geométrica ( $P(X=x) = \alpha(1-\alpha)^{x-1}$ ) especificado por su varianza  $\sigma^2 = (1-\alpha)/\alpha^2$ . El último término permite que ocurran pasos mutacionales de más de una repetición simple. El modelo *GSM* corresponde a una versión simplificada del *TPM* en la que  $P_{SMM}=0$ .

Un modelo alternativo, el *IAM* (Infinite Allele Model o modelo de alelos infinitos) (Kimura y Crow, 1964), propone que todas las mutaciones son posibles, sin que existan restricciones en el número de unidades repetidas mutadas. El *KAM* (K-allele model) (Crow y Kimura, 1970) propone que existen exactamente  $k$  posibilidades alélicas y que cualquier alelo tiene una posibilidad constante  $[\mu/(k-1)]$  de mutar hacia cualquiera de las otras  $k-1$  posibilidades alélicas.

Para todos estos modelos mutacionales excepto el *IAM*, los alelos pueden mutar hacia estados alélicos ya presentes en la población y de ahí generar lo que se denomina homoplasia.

Originalmente el concepto de homoplasia fue usado por los evolucionistas para describir el hecho de que un carácter presente en dos especies no deriva del mismo carácter presente en un ancestro común, sino que la similitud es debida a factores tales como la convergencia, paralelismo o reversión. Para un marcador genético, la homoplasia ocurre cuando diferentes copias de un locus son idénticas en estado pero no idénticas por descendencia. Esta identidad en estado ocurre normalmente a través de eventos mutacionales y está relacionada con el camino a través del cual la mutación produce nuevos alelos, de ahí que la homoplasia *per se* se encuentra implícita al modelo mutacional del marcador, con lo que es difícil considerar las dos características evolutivas (homoplasia y modelo mutacional) de forma independiente.

La homoplasia también depende de factores evolutivos independientes del modelo mutacional como el grado de mutación, el tamaño efectivo de la población y el tiempo de divergencia entre poblaciones, aunque estos están pobremente formalizados teóricamente.

Dentro de la homoplasia por tamaño (Size homoplasy, SH), existe una parte que puede ser medida a través de técnicas que permiten detectar cambios nucleotídicos en las secuencias de los microsatélites, como son la técnica SSCP (Single Strand Conformation Polimorphysm)(Orita y col., 1989a,b) y la secuenciación. Esta parte de la homoplasia por tamaño se conoce como homoplasia por tamaño accesible molecularmente (*Molecularly Accesible Size Homoplasy, MASH*), y normalmente tiene su origen en cambios nucleotídicos en las secuencias flanqueantes a la región repetida, y en el caso de microsatélites que no poseen una repetición perfecta, por diferentes combinaciones de los motivos repetidos (Estoup y col., 2002)

#### *II.8.1.d.2.7. Factores que afectan a los procesos mutacionales en microsatélites.*

Mediante estudios *in vitro*, Schlotterer y Tautz (1992), usando oligonucleótidos sintéticos y diversas polimerasas, llegaron a la conclusión de que el nivel de deslizamiento está relacionado con el tamaño de la unidad repetida (es mayor en dinucleótidos (Primmer y col., 1996a)) y con el tipo de repetición (es menos frecuente para fragmentos ricos en dG-dC). Levinson y Gutman (1987) encontraron en procariotas evidencias de que los microsatélites con un alto número de repeticiones tenían un grado de mutación más alto que aquellos con menor número de repeticiones, lo cual parece lógico, puesto que las posibilidades de que ocurra el fenómeno de deslizamiento de la polimerasa son mayores cuantas más repeticiones existan. Esta circunstancia se mantiene incluso dentro de un mismo microsatélite, donde los alelos más largos tienen más posibilidades de mutar.

Aún cuando parece existir un sesgo en el grado mutacional favorable a los microsatélites con un mayor número de repeticiones, es probable que exista un mecanismo que actúe como freno de este fenómeno, puesto que es difícil encontrar microsatélites con un número de repeticiones superior a 30. Valdes y col (1993) encontraron en la especie humana que de 383 microsatélites (repetición CA) descubiertos, solo 45 sobrepasaban el número de 20 repeticiones. El mecanismo por el cual se produce este freno en el número de repeticiones aún no se conoce, sin



embargo podría estar relacionado con la estabilidad cromosómica, ya que ciertas patologías como el síndrome del cromosoma X frágil están asociadas a microsatélites con un número anormalmente alto de repeticiones (Fu y col., 1991).

Existen algunos estudios que sugieren que la estructura de la repetición del microsatélite es también determinante en el proceso mutacional. Estoup y col. (1995) examinaron en abejas la variación encontrada en dos microsatélites con una estructura irregular (la secuencia repetida es interrumpida por alguna mutación puntual) para estudiar el nivel de homoplasia que existía entre ambas poblaciones. Los resultados observados demostraron que cuanto más compleja fuera la irregularidad en la secuencia repetida, en menor medida se ajustaban los resultados encontrados al modelo mutacional de eventos simples (SSM, Single Step Mutation).

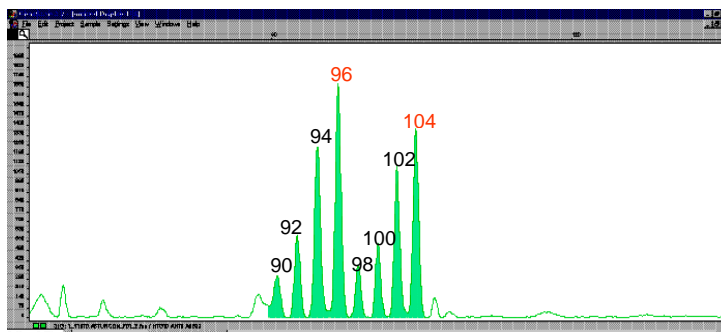
Otra tendencia observada en los procesos mutacionales de los microsatélites es lo que se conoce como asimetría positiva, según la cual las mutaciones tienden a la creación de alelos más largos (Weber y Wong, 1993; Ashley y Warren, 1995; Primmer y col., 1996; Amos y col., 1996).

Se ha sugerido un último factor a tener en cuenta que propone que los machos mutan más a menudo que las hembras (Hurst y Ellegren, 1998). Una explicación a esta circunstancia puede ser el hecho de que se produzcan un mayor número de divisiones celulares durante la espermatogénesis, que durante la ovogénesis, y que esto lleve a un incremento del grado mutacional. Ellegren (2000) encontró cinco veces más mutaciones en hombres que en mujeres.

#### *II.8.1.d.2.8. Problemas laboratoriales potenciales de los microsatélites.*

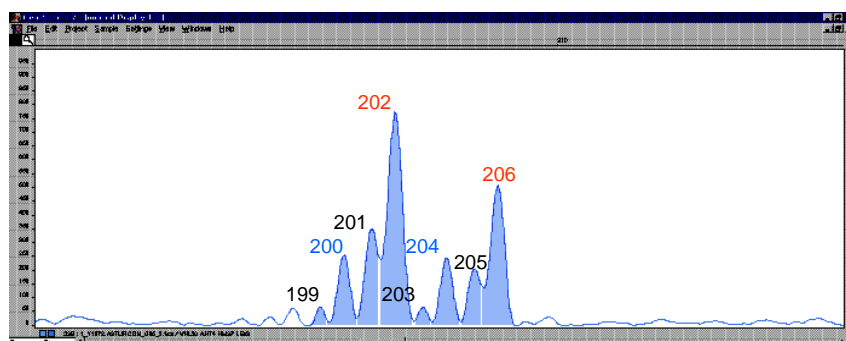
- a) Alelos nulos: en algunas ocasiones se puede producir la no amplificación de alguno de los alelos de un microsatélite porque exista una mutación en la zona donde deben primar los cebadores. Esta situación puede verse enmascarada en el caso de animales heterocigotos los cuales son contabilizados como homocigotos, con el consiguiente error en la estima de la variabilidad.
- b) *Stutter bands o Bandas sombra*: durante el proceso de amplificación de la *Taq* polimerasa también se registran fenómenos de deslizamiento de las hebras de ADN que quedan patentes como bandas accesorias y de menor intensidad (Figura 2.27.) que la principal y en la mayor parte de las ocasiones con una o dos

repeticiones menos. Esta situación afecta negativamente a la identificación de los alelos, y en especial cuando se trata de individuos heterocigotos cuyos alelos difieren por un número escaso de repeticiones.



**Figura 2.27.:** Imagen obtenida con el software GeneScan™ (AppliedBiosystems) de la amplificación de un microsatélite en un individuo heterocigoto. En rojo aparece el tamaño en pares de bases de los alelos y en negro el tamaño de las *stutter bands* o bandas sombra de cada alelo, que son consecuencia de la amplificación de una, dos o tres repeticiones menos que el alelo verdadero.

- c) No adición de la adenina: la mayor parte de las polimerasas comerciales tiene la característica especial de añadir una adenina al final de los fragmentos amplificados (Figura 2.28.), sin embargo esta situación depende del tiempo de extensión y de la cantidad de fragmentos generados, por lo que puede darse la circunstancia de que haya fragmentos con adenina final y otros sin ella, situación que también puede entorpecer la identificación de los alelos.



**Figura 2.28.:** Imagen obtenida con el software GeneScan™ (AppliedBiosystems) de la amplificación de un microsatélite en un individuo heterocigoto. En rojo aparece el tamaño en pares de bases de los alelos, en azul el tamaño de las *stutter bands* o bandas sombra de cada alelo, y en negro el tamaño de la banda sin la adición de la adenina.

II.8.1.e. Marcadores en el ADN mitocondrial.

Se trata de una molécula circular que se encuentra presente en unas organelas subcelulares denominadas mitocondrias, de un tamaño entre 15-20 kb y compuesto por 37 genes. Una región de control (D-loop) de aproximadamente 1 kb inicia la replicación y la transcripción. La tasa de mutación de algunas zonas del ADN mitocondrial es muy alta y esto ha hecho que se haya empleado en numerosas ocasiones para analizar la estructura de poblaciones, como por ejemplo hicieron Avise y col. 1994. Esta molécula carece de tasa de recombinación y se traduce exclusivamente a través de la línea materna, de ahí que el número de diferencias nucleotídicas entre el genoma mitocondrial sea reflejo directo de la distancia genética que los separa. (Ishida y col., 1994a,b; Wang y col., 1994; Xu y Arnason, 1994; Marklund y col., 1995; Xu y Arnason, 1996; Bowling y col., 1998; Oakenfull y Ryder, 1998).

El ADN mitocondrial es una buena herramienta en el caso de que sólo se disponga de muestras escasas o muy degradadas, ya que el número de copias por célula es mayor que de ADN genómico. Esta razón es principalmente la que le ha convertido en el marcador de elección en el área de la medicina forense (Junge y col., 2002; Andreasson y col., 2002). Además, en situaciones en las que se carece de la muestra de un individuo para su comparación directa con una muestra biológica, debido a que se hereda exclusivamente por vía materna, cualquier otro individuo relacionado maternalmente puede utilizarse como muestra de referencia.

Cuando se ha usado como medidor de diversidad genética entre poblaciones, esta herencia materna ha permitido que se pueda usar para inferir patrones de migración, fechas de expansión, etc.; sin embargo, su poder de discriminación es muy inferior al de otros marcadores genómicos, lo que unido al hecho de que las posibilidades de contaminación laboratorial de las muestras es muy alta, lo han convertido en una alternativa válida, únicamente cuando no se dispone de marcadores nucleares o las muestras para analizar son de difícil procesado.

II.8.1.f. Cromosoma Y.

El ADN del cromosoma Y localizado fuera de la región pseudoautosómica no recombina con el cromosoma X y por tanto es todo él de herencia paterna. Aunque tiene un menor grado de mutación que el ADNmt ofrece una fuente alta de

polimorfismos debido a que se trata de ADN no codificante. (Khodjet El Khil y col., 2001; Oota y col., 2001; SundQvist y col., 2001; Hurles y col., 2002; Stone y col., 2002).

El estudio de la variabilidad existente en el cromosoma Y puede registrarse por medio de diferentes marcadores genéticos (SNPs, microsatélites,...) y con diferentes objetivos. Un objetivo habitual, es conocer el nivel de introgresión de ancestros masculinos en determinadas poblaciones, lo que nos puede dar idea de cuáles han sido los patrones migratorios de los machos en las poblaciones bajo estudio (Ward y col., 2001; Hanotte y col., 2002).

Al igual que ocurría con el ADNmt, las variaciones presentes en el cromosoma Y, sólo registran la variabilidad correspondiente a uno de los sexos, el sexo masculino, y en el caso particular del genoma equino, existen pocas secuencias de esta región descritas, lo que dificulta hoy en día su elección como marcador genético para estudios poblacionales.

#### II.8.1.g. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs).

Se trata de pequeños cambios nucleotídicos puntuales que ocurren dentro del genoma consistentes en un cambio nucleotídico simple como por ejemplo la sustitución de una adenina (A) por cualquiera de los otros tres nucleótidos: citosina (C), timina (T) o guanina (G), delecciones o inserciones. Para que un cambio nucleotídico sea considerado como un SNP es necesario que la frecuencia del alelos menos frecuente sea al menos del 1%.

Aunque en principio cualquier nucleótido puede ser reemplazado por los tres alternativos, en la práctica la mayor parte de los SNPs son bialélicos, debido a que la frecuencia de sustitución por nucleótido y por año, en los mamíferos es de  $1 \times 10^{-9}$  y  $5 \times 10^{-9}$  (Li y col., 1981; Martínez-Arias y col., 2001) ya que existe un sesgo en las sustituciones dando prevalencia a dos tipos de cambios, purina  $\leftrightarrow$  purina (A  $\leftrightarrow$  G) o pirimidina  $\leftrightarrow$  pirimidina (C  $\leftrightarrow$  T) (Collins y Jukes, 1994).

La frecuencia de aparición de estas variaciones a lo largo del genoma es variable dependiendo de la región estudiada, así Wang y col. (1998) encontraron más de 3000 SNPs escaneando una región de 2,3 Mb del ADN humano, registrando una frecuencia de aparición de 1 SNP cada 721 pb. Lai y col. (1998) al estudiar una región de 4-Mb del gen APOE en el cromosoma 19 de la especie humana detectaron un SNP

cada 1,1 kb. Sin embargo, Konfortov y col. (1999) encontraron en el gen de la leptina, una frecuencia de 1 SNP cada 89 pb, y en el gen de la proteína precursora amiloide (APP), 23 SNPs en una secuencia intrónica de 302 pb, lo que da una frecuencia de 1 SNP cada 13 pb. En el caso de los caballos Shubitzowski y col. (2001) encontraron una frecuencia de un SNP cada 853 pb en el caso de los exones y un SNP cada 530 pb en el caso de los intrones, después de secuenciar 9380 pb de secuencia codificante y 16961 pb de secuencia intrónica correspondiente a 50 genes diferentes. Por tanto, a pesar de que poseen una distribución más o menos homogénea a lo largo del genoma, su incidencia es mucho más alta en regiones no codificantes, y existen genes que presentan una tasa de mutación más alta que otros.

La ventaja de los SNPs frente a otros marcadores radica principalmente en los métodos de diagnóstico disponibles para su genotipado, ya que al tratarse de mutaciones de un solo nucleótido existen limitadas variantes alélicas, y esto facilita que puedan diagnosticarse muchos SNPs en muy poco tiempo. En esta dirección se han desarrollado los microarrays (Huang y col., 2001; Lindroos y col., 2002), la pirosecuenciación (Ronaghi y col., 1996; Wasson y col., 2002), las sondas marcadas con fluorocromos (Molecular Beacons (Tyagi y Kramer, 1996, Marras y col., 2003), sondas Taqman (Livak, 1999; Ranade y col., 2001), la técnica *Primer-extension* o minisequenciación.

Hoy en día la alternativa a los microsatélites en la construcción de mapas genéticos son los SNPs, que presentan ventajas y desventajas con respecto a los microsatélites. Al tratarse de marcadores comúnmente bialélicos, la información por SNP es baja comparada con los microsatélites. Se ha estimado que son necesarios aproximadamente 5 SNPs para equiparar la información que proporciona un microsatélite, lo que significa que son necesarios 2000 SNPs para estudiar los 10 cM que permite estudiar un microsatélite. En el caso de la especie equina, una desventaja actual con respecto a los microsatélites es que todavía no existe un conocimiento del genoma tan profundo como para contar con un número suficiente de SNPs y con una distribución homogénea a lo largo del genoma. Además, los microsatélites tienen la ventaja de que alelos poco frecuentes pueden estar asociados con el carácter de interés, mientras que si en un SNP uno de los dos alelos es relativamente poco frecuente, entonces no se tratará de un marcador muy informativo puesto que muchos de los individuos estudiados mostrarán el mismo genotipo.

Otra de las desventajas de los SNPs es que tienden a ser específicos de especie; así un marcador que es polimórfico en una especie puede que no lo sea en otra, y por tanto deberán generarse específicamente para la población bajo estudio, con el consiguiente encarecimiento del análisis.

Las ventajas de los SNPs es que son muy frecuentes en el genoma, con lo que se incrementa notablemente la densidad de los mapas genéticos, y esto hace posible aumentar los sistemas de “haplotipado” para genes o regiones de interés. Además en ciertos casos el propio SNP puede ser el responsable del fenotipo bajo estudio. Otra de sus principales ventajas radica en la posibilidad de implementar sistemas de genotipado masivo, que permiten analizar un número muy alto de SNPs en poco tiempo.

#### II.8.1.h. Secuenciación (Maxam y Gilbert, 1977) (Sanger y col., 1977).

Existen dos métodos de secuenciación, químico y enzimático, los cuales comparten algunos principios básicos. Se generan fragmentos de ADN de una sola hebra cuyos tamaños se diferencian en una sola base y cuyas moléculas se visualizan a través de dos tipos de marcaje, radiactivo o fluorescente. Los fragmentos amplificados utilizando nucleótidos marcados con diferentes fluorocromos son los más utilizados en la actualidad, se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida y mediante un láser que excita los fluorocromos se recoge las lecturas de emisión y se traducen en una sucesión de nucleótidos que componen la secuencia.

Este método de análisis del genoma constituye la última expresión de análisis del mismo, ya que mediante la secuenciación podemos registrar toda la variabilidad existente y detectar la existencia de mutaciones al comparar secuencias de diferentes individuos.

#### II.8.2. Mecanismos evolutivos que actúan sobre las poblaciones naturales.

Tradicionalmente los procesos a través de los cuales se producen cambios en las frecuencias génicas y genotípicas se han clasificado en dos, los procesos sistemáticos que tienden a cambiar las frecuencias génicas en una forma predecible tanto en dirección como en cantidad y que incluyen a la migración, mutación y selección; y los procesos dispersivos los cuales únicamente son predecibles en cantidad pero no en dirección (Falconer y Mackay, 1996).

### II.8.2.a. Procesos sistemáticos

#### *II.8.2.a.1. Migración.*

Es el proceso por el cual individuos de una población se desplazan a otra, de modo que al integrarse en ella, sus genes interaccionan y pueden ocasionar un cambio en las frecuencias génicas y genotípicas de ambas poblaciones. La incidencia de este cambio dependerá de las frecuencias alélicas en cada una de las razas y del tamaño relativo de las poblaciones. La migración actúa siempre como una fuerza homogeneizadora.

La migración puede modelizarse de forma sencilla del siguiente modo:

- Población receptora  $\alpha$ : frecuencia alélica  $q_\alpha$
- Población migrante  $\beta$ : frecuencia alélica  $q_\beta$
- $m$ : proporción de migrantes recibidos por la población  $\alpha$  desde  $\beta$ .
- $1-m$ : número de individuos de la raza local
- Frecuencia alélica ( $q_1$ ) en la población  $\alpha$  después de una generación:

$$q_1 = m q_m + (1 - m) q_0 = m(q_m - q_0) + q_0$$

El cambio en una generación de la frecuencia alélica ( $q$ ) se calcula como:

$$\Delta q = m(q_m - q_0)$$

donde  $q_m$  es la frecuencia de  $q$  en la población  $\alpha$  después de la migración, y  $q_0$  es la frecuencia de  $q$  en la población  $\alpha$  antes de la migración.

Migración y mutación son las dos únicas vías posibles a través de los cuales se pueden introducir alelos nuevos en una población.

#### *II.8.2.a.2. Mutación.*

Es una fuente de variabilidad genética consistente en el más sencillo de los casos en la sustitución de un nucleótido por otro (transición: purina $\leftrightarrow$ purina o pirimidina $\leftrightarrow$ pirimidina; transversión: purina $\leftrightarrow$ pirimidina) las cuales pueden

resultar selectivamente neutras en el caso de que afecten a zonas no codificantes o pueden tener un efecto sobre la estructura de la proteína cuando al afectar a la zona codificante ocasionan un cambio aminoacídico. Otra posibilidad consiste en la pérdida (delección) o ganancia de material genético (inserción) cuya repercusión puede ser la misma que en el caso anterior.

Al margen de esta circunstancia hay que tener en cuenta el efecto que la mutación puede tener sobre las propiedades genéticas de la población, y en este sentido se puede hablar de mutaciones no recurrentes, aquellas que se producen de forma aislada en un individuo de la población y por tanto tienen muy bajas probabilidades de trascender a generaciones futuras, y de mutaciones recurrentes, que se producen regularmente con una frecuencia característica, de modo que nunca se produciría una pérdida completa a lo largo de las generaciones (Falconer y Mackay, 1996). La frecuencia con la que se produce una mutación es lo que se conoce como tasa de mutación, siendo los valores normales entre  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  lo que significa que un gameto entre 10000 ó 1000000 es portador de un alelo mutado en cualquier locus.

#### *II.8.2.a.3. Selección.*

Se consideran dos tipos de selección, la primera de ellas es la selección natural, que ocurre de forma habitual en la naturaleza, y en la que unos individuos se ven favorecidos por poseer una mayor capacidad reproductiva y/o de supervivencia (valor adaptativo). La segunda es la selección artificial practicada por el hombre, quien va a seleccionar a los reproductores y sus descendientes según sus intereses. En ambos casos no todos los genes van a tener las mismas posibilidades de ser transmitidos a la descendencia, con lo que se van a observar cambios en las frecuencia genotípicas entre ambas generaciones. Se conoce como aptitud de un individuo, su capacidad de aportar descendientes en la siguiente generación (Falconer y Mackay, 1996).

La fuerza con que actúa la selección se conoce como intensidad de selección y se cuantifica como la reducción proporcional en la contribución gamética de un genotipo particular comparado con un genotipo estándar (el más favorecido) (Falconer y Mackay, 1996).



II.8.2.b. Procesos dispersivos.

*II.8.2.b.1. Deriva genética.*

Es un proceso natural que tiende a homogeneizar la información genética de los individuos de una población como consecuencia de la transmisión aleatoria de determinados alelos de una generación a otra. Se trata de un proceso que al mismo tiempo que provoca una reducción en la variación genética dentro de razas, con un incremento en la frecuencia de homocigotos dentro de la misma, va a ocasionar que poblaciones aisladas se vayan diferenciando más, puesto que la probabilidad de que dos poblaciones aisladas evolucionen igual es muy baja.

II.8.3. Los cuellos de botella en las poblaciones.

Muchas poblaciones sufren una reducción severa en el censo de su población llamado cuello de botella, como consecuencia de una fragmentación de su hábitat o por aislamiento. Detectar estos cuellos de botella es importante porque conlleva consecuencias perjudiciales para el futuro de las poblaciones: incremento de los niveles de endogamia, pérdida de variabilidad genética, fijación de alelos deletéreos, etc; que pueden llevar en último término a la extinción de la población (Frankel y Soule, 1981; Hedrick y Millar, 1992; Brakefield y Saccheri, 1994; Jiménez y col., 1994; Ralls y col., 1994; Frankham, 1995; Newman, 1996).

Cuanto más reciente es un cuello de botella, mayores posibilidades hay de minimizar los efectos negativos, por medio de estrategias de apareamiento o introduciendo algunos migrantes.

Es frecuente que poblaciones que han atravesado recientemente un cuello de botella hayan perdido los alelos raros, pero pueden mantener aún niveles altos de heterocigosis, ya que su pérdida es más lenta. Este hecho ha sido notificado por numerosos autores (Nei y col., 1976; Denniston, 1978; Watterson, 1984; Maruyama y Fuerst, 1985; Allendorf, 1996).

Una vía para detectar estos cuellos de botella consiste en una monitorización genética de las poblaciones, ya que las monitorizaciones demográficas tradicionales pueden no detectarlos en determinadas circunstancias.

#### II.8.4. Los estadísticos F de Wright como medidores de la variabilidad genética.

La teoría denominada *teoría de los índices de fijación o estadísticos F*, fue propuesta por Wright en 1965, y mide la pérdida de heterocigosis como consecuencia de una subdivisión poblacional. Incluye tres parámetros:  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$ ,  $F_{IT}$ .

Si los expresamos en términos de pérdida de heterocigosis, hay que considerar tres niveles dentro de la jerarquía subpoblacional: organismos individuales (I), subpoblaciones (S) que asumiríamos como razas, y la población total (T). Por tanto tendríamos:

$H_I$  = heterocigosis observada media en las subpoblaciones, considerando  $k$  subpoblaciones

$$H_I = \sum_{i=1}^k H_i / k$$

$H_S$  = heterocigosis media que esperaríamos en las subpoblaciones donde ocurre cruzamiento aleatorio.  $p_{is}$  es la frecuencia del alelo  $i$  en la subpoblación  $s$ , y  $H_S$  es la heterocigosis esperada en el conjunto de  $k$  subpoblaciones, bajo equilibrio Hardy-Weinberg

$$H_S = 1 - \sum_{i=1}^k p_{i,s}^2$$

$H_T$  = heterocigosis que se esperaría si todas las subpoblaciones se agrupasen y se produjera un cruzamiento aleatorio.  $p_i^2$  es la frecuencia media del alelo  $i$  en la población total

$$H_T = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

El coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  mide la reducción en la heterocigosis de un individuo debido al cruzamiento no aleatorio dentro de su subpoblación

$$F_{IS} = (H_S - H_I)/H_S,$$

El índice de fijación  $F_{ST}$  mide la reducción de la heterocigosis de una subpoblación debido al efecto combinado de la migración y la deriva genética

$$F_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$$

y el coeficiente de endogamia total  $F_{IT}$  estima las contribuciones del cruzamiento no aleatorio dentro de subpoblaciones y otra debida a la subdivisión propiamente dicha.

$$F_{IT} = (H_T - H_I)/H_T,$$

Los tres términos se relacionan por medio de la fórmula:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$$

En 1973 Nei propuso un acercamiento alternativo al análisis de la subdivisión de poblaciones, para el cual no es necesario el conocimiento del genotipo de los animales, ya que puede calcularse directamente a partir de las frecuencias alélicas, en términos de heterocigosis esperadas (diversidades génicas) dentro y entre poblaciones.

Este método tiene la ventaja de no verse afectado por el número de alelos por locus, ni por fuerzas evolutivas tales como mutación, selección y migración, ni tampoco por el sistema reproductivo.

$$G_{ST} = D_{ST}/H_T$$

donde  $D_{ST}$  es la media de la diversidad génica entre subpoblaciones  $(H_T - H_S)$  y  $H_T$  es la diversidad génica en la población total.

### II.8.5. Distancias genéticas.

El cálculo de las distancias genéticas entre dos poblaciones proporciona una estima relativa del tiempo que ha pasado desde que ambas poblaciones divergieron. Estimas bajas de las distancias pueden ser indicativas de la existencia de subpoblaciones en las cuales hay cruzamiento aleatorio y entre las que hay una cantidad pequeña de flujo génico, o simplemente porque a pesar de que están separadas ha pasado un período de tiempo muy breve desde que divergieron. Cuando dos poblaciones están aisladas genéticamente, los procesos de mutación y deriva genética tienden a una diferenciación de las frecuencias alélicas de los loci neutros, diferenciación que es más acusada a medida que pasa el tiempo.

Una medida de distancia genética para que sea ajustada debe reunir dos propiedades fundamentales, ser lineal con el tiempo y poseer una baja varianza.

De acuerdo a la naturaleza mutacional del marcador empleado se han diseñado diferentes estimadores de las distancias genéticas que se pueden clasificar en dos grupos, aquellas basadas en el modelo IAM (Infinite Allele Model)(Kimura y Crow, 1964), y el modelo SMM (Step Mutation Model)(Kimura y Ohta, 1978), aunque al margen queda otro grupo más heterogéneo de distancias no basadas sobre ningún modelo mutacional.

#### II.8.5.a. Estimadores de distancias genéticas basados en el modelo IAM

Un estimador muy simple de distancia genética se basa en la proporción de alelos compartidos (Bowcock y col., 1994). Esta medida de distancia puede ser calculada entre individuos o entre poblaciones. Para comparar pares de individuos la proporción de alelos compartidos es estimada por:

$$P_{SAI} = \frac{\sum_u S}{2u}$$

donde el número de alelos compartidos es sumado sobre todos los loci. La distancia entre individuos es estimada por:

$$D_{SAI} = 1 - P_{SAI}$$

Esta medida de distancia puede ser muy útil para posicionar animales desconocidos dentro de la población correcta (Estoup y col., 1995). Si se conoce la subdivisión poblacional, entonces la distancia entre poblaciones, ajustada para la variación dentro de poblaciones, puede ser calculada por:

$$D_{SAB} = 1 - \frac{2\bar{P}_{SAB}}{\bar{P}_{SA1} + \bar{P}_{SA2}}$$

siendo la proporción media de alelos compartidos entre y dentro de las poblaciones, 1 y 2 ( $\bar{P}_{SAB}$ ,  $\bar{P}_{SA1}$ ,  $\bar{P}_{SA2}$ ) respectivamente, se calculan sobre todas las posibles combinaciones de los individuos muestreados.

Otro método de estimación de la distancia genética fue desarrollado por Cavalli-Sforza y Edwards (1967), donde los datos se transforman en una distancia angular  $\theta$ . En este caso las poblaciones son conceptualizadas como puntos en un espacio euclidiano  $m$ . Identificadas como  $m$  frecuencias alélicas (ej.  $m$  equivale al número total de alelos en ambas poblaciones). La distancia,  $\theta$ , es el ángulo entre estos dos puntos donde,

$$\cos(\theta) = \sum_i \sqrt{x_i y_i}$$

$x_i$ ,  $y_i$  son las frecuencias alélicas del alelo  $i$  en las poblaciones  $x$  e  $y$  respectivamente. La distancia cuerda  $D_{CH}$  es la distancia en el espacio entre los dos puntos medida como una línea recta

$$D_{CH} = \left(\frac{2\sqrt{2}}{\pi}\right)\sqrt{1-\cos\theta}$$

Un valor de 1 de esta distancia indica una fijación completa de alelos alternativos en cada población. La distancia para todos los loci se calcula aplicando el teorema de Pitágoras, donde la distancia al cuadrado de todos los loci equivale a la suma del cuadrado de las distancias de cada locus.

La distancia más usada en la mayoría de trabajos fue desarrollada por Nei (1972). La distancia genética standard de Nei es calculada

$$D_S = -\ln I$$

donde  $I$  es una medida de identidad genética. La identidad es estimada como

$$I = \frac{J_{XY}}{\sqrt{J_X J_Y}}$$

$J_{XY}$ ,  $J_X$  y  $J_Y$  representan la media para todos los loci de  $\sum x_i y_i$ ,  $\sum x_i^2$ , y  $\sum y_i^2$  para cada locus.

#### II.8.5.b. Estimadores de distancias genéticas basados en el modelo SSM

Las medidas de distancia genética desarrolladas bajo el modelo mutacional SSM asumen que dos alelos que difieren en tres unidades de repetición han debido sufrir al menos 3 mutaciones desde su ancestro común, así

$$a1 - a2 = \sum_{n=1}^{\alpha} x_n$$

donde  $a$  es el número de repeticiones de un alelo,  $\alpha$  es el número de mutaciones que han ocurrido y  $x_n$  es el incremento en la longitud de la repetición.

Estas medidas de distancia presentan la ventaja de incrementarse linealmente con el tiempo y el principal problema el de presentar una varianza alta debido a su dependencia de las variaciones en el tamaño de las poblaciones.  $(\delta\mu)^2$  resuelve en parte este problema y la hace más robusta para la reconstrucción de árboles filogenéticos.

$ASD$  (Goldstein y col., 1995a)(Slatkin, 1995a),  $(\delta\mu)^2$  (Goldstein y col., 1995b) y  $D_{sw}$  (Slatkin, 1995b) hacen uso de la diferencia de tamaño entre los alelos, así

$$ASD = \frac{\sum_k^r \sum_{i,j} ((i-j)^2 x_{ik} y_{jk})}{r}$$

siendo  $x_{ik}$  e  $y_{jk}$  las frecuencias alélicas en las poblaciones X e Y de los alelos con  $i$  y  $j$  repeticiones respectivamente. En el caso de  $(\delta\mu)^2$  la fórmula se expresa como

$$(\delta\mu)^2 = \frac{\sum_j^r (\mu_{xj} - \mu_{yj})^2}{r}$$

$\mu_{xj}$  y  $\mu_{yj}$  son el número medio de repeticiones encontrado en los alelos de las poblaciones X e Y. Para  $D_{sw}$  la fórmula es

$$D_{sw} = W_{xy} - \frac{(W_x + W_y)}{2}$$

$$W_x = \frac{\sum_k^r \sum_{i \neq j} (|i - j| x_{ik} x_{jk})}{r} \quad W_y = \frac{\sum_k^r \sum_{i \neq j} (|i - j| y_{ik} y_{jk})}{r} \quad W_{xy} = \frac{\sum_k^r \sum_{i \neq j} (|i - j| x_{ik} y_{jk})}{r}$$

donde  $W_x$ ,  $W_y$ , y  $W_{xy}$  son las probabilidades de que dos alelos difieran cuando sean elegidos aleatoriamente desde diferentes poblaciones ( $W_{xy}$ ) o desde la misma población ( $W_x$  y  $W_y$ ). En estas probabilidades  $x_i$  e  $y_i$  son las frecuencias de los alelos  $i$  y  $j$  en las poblaciones X o Y.

Slatkin (1995a) propuso una medida de distancia  $R_{st}$  análoga al  $F_{st}$  de Wright (1965) adaptada para microsatélites. Se calcula siguiendo la fórmula

$$R_{st} = \frac{(S_{bar} - S_w)}{S_{bar}}$$

En la que  $S_w$  es la suma sobre todos los loci de dos veces el peso medio de la varianza dentro de poblaciones V(A) y V(B), y  $S_{bar}$  es la suma sobre todos los loci de dos veces la varianza de las poblaciones combinadas V(A+B).

#### II.8.5.c. Estimadores de distancias genéticas no basados en ningún modelo mutacional

Estas distancias son especialmente indicadas en el caso de que se estudien taxones muy relacionados, ya que en ellas lo que se estima principalmente es el efecto de la deriva genética.

Aplicadas a múltiples loci, las tres distancias más representativas  $D_a$  (Nei y col., 1983),  $D_c$  (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967) y  $D_{as}$  (Stephens y col., 1992) toman la siguiente fórmula

$$D = c \left( 1 - \frac{1}{r} \sum_j^r \sum_i^{m_j} (x_{ij} y_{ij})^a \right)^b$$

$X_i$  y  $Y_i$  son las frecuencias de alelos de tamaño  $i$  en poblaciones  $X$  e  $Y$  respectivamente, y  $a$ ,  $b$ , y  $c$  son constantes. En el caso de  $D_{as}$ ,  $a$ ,  $b$ , y  $c$  equivalen a 0. En el caso de  $D_a$ ,  $a$  equivale a 0,5, mientras que  $b$  y  $c$  valen 0. En el caso de  $D_c$ ,  $a$  y  $b$  valen 0,5 y  $c$  es  $2\sqrt{2}/\Pi$ .

Aunque la esperanza de estas distancias es claramente diferente no se ha visto que existan diferencias sustanciales entre la precisión de  $D_{as}$  y  $D_a$  para la reconstrucción de árboles filogenéticos.  $D_c$  es ligeramente menos eficiente que  $D_a$  en la reconstrucción de árboles filogenéticos si asumimos un modelo mutacional SSM (Takesaki y Nei, 1996).

Otros estimadores interesantes de la diferenciación de poblaciones genéticamente próximas, que cuantifican principalmente el efecto de la deriva genética son  $F_{st}$  (Wright, 1965) y  $\theta$  (Weir y Cockerman, 1984).

En el caso de  $\theta$  se calcula como  $a / (a+b)$ , donde  $a$  es la varianza entre taxones y  $b$  es la varianza dentro de taxones, siendo  $F_{st} = -\ln(1-\theta)$ , también expresado como

$$F_{st} = \frac{H_t - H_s}{H_t}$$

donde  $H_t$  es la heterocigosis esperada de un individuo tomado al azar dentro del total de las poblaciones, y  $H_s$  es la heterocigosis media esperada en dicha población.

#### II.8.6. Árboles filogenéticos.

Podemos definir como filogenia una reconstrucción de la historia evolutiva de un grupo de organismos, siendo el árbol filogenético la reconstrucción gráfica de esta evolución.

Los dendrogramas se pueden construir partiendo de numerosos y diversos datos: genéticos, proteicos, morfológicos, fisiológicos, histoquímicos, etc. En general se puede hacer una distinción entre datos fenéticos y datos cladísticos. Las relaciones fenéticas son definidas por Sneath y Sokal (1973) como similitudes basadas en un grupo de datos fenotípicos de los organismos en estudio, mientras que las relaciones cladísticas contienen información acerca sobre el ancestro lo que les confiere carácter evolutivo. Ambas relaciones se representan por medio de árboles filogenéticos o



dendrogramas. En ocasiones se usan los términos fenograma y cladograma según la información que se evalúe. En el cladograma es imprescindible el concepto de tiempo entre los grupos de organismos que se comparan, mientras que en el fenograma este concepto no lo es.

En general los árboles filogenéticos evalúan las coincidencias y diferencias entre un grupo de organismos. Cuantos más caracteres muestran en común dos organismos, presumiblemente más unidos evolutivamente estarán, y más cercanos dentro del árbol.

En el caso de los árboles basados en distancias genéticas podemos considerar dos métodos principales de agrupamiento: UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic average) (Sneath y Sokal, 1973) y Neighbour-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987).

El método UPGMA es el método más simple de construcción de un árbol que asume que los grados de evolución entre los diferentes grupos son prácticamente constantes. En primer lugar busca los dos grupos que son más similares y entonces los trata como un nuevo grupo único, con el que va a comparar los restantes y a proceder de forma similar con el resto de forma sucesiva.

El método NJ está basado en el principio de evolución mínima que no requiere que el grado de evolución de los grupos que participan sea el mismo, de modo que se trata de un árbol sin raíz y sin implicaciones evolutivas para los grupos bajo estudio.

Una vía para valorar la fiabilidad del agrupamiento mostrado por cualquiera de los dos métodos, es lo que se conoce como bootstrapping (Weir, 1990), consistente en la creación de pseudoréplicas mediante remuestreo. El bootstrapping permite valorar si la distribución de caracteres ha estado influenciada por efectos estocásticos. Las pseudoréplicas son generadas por muestreo aleatorio de la matriz de caracteres original para crear una nueva matriz del mismo tamaño que la original. La frecuencia con la que una rama dada es encontrada es grabada como la proporción de bootstrap. Estas proporciones pueden ser usadas de forma cautelosa como una medida de la fiabilidad de las ramas individuales en el árbol óptimo.

### II.8.7. Análisis de correspondencia.

Una medida de diversidad genética básica es la que se obtiene de aplicar un análisis clásico multivariante factorial, el Análisis de Correspondencia (Benzécri, 1973; Lebart, Morineau y Tabard, 1977; Excoffier y Pagès, 1990) el cual permite estudiar una variable cualitativa (raza) en función de otras variables cualitativas (alelos) y en el que el término clásico de inercia puede ser asimilado al de diversidad. En definitiva, el análisis de correspondencia establece relaciones entre categorías de variables, definiendo similitudes o diferencias entre ellas, lo que permite después su agrupamiento si se detecta que existe “correspondencia” entre ellas. Esta aproximación fue desarrollada por Cavalli-Sforza y col. (1994), aplicada a datos de varias poblaciones humanas.

El análisis se efectúa a partir de una tabla de contingencia por raza en la que las filas están constituidas por la variable a explicar (la raza) y las columnas el conjunto de variables explicativas (los alelos), tratándose de la modalidad de correspondencia múltiple en el que los diferentes loci se consideran no ligados (Lebart y col., 1995). Los resultados permiten obtener la importancia relativa (inercia) tanto de las poblaciones como de los alelos con una representación gráfica mediante un sistema de puntos situados en un espacio euclidiano y la verificación de su grado de robustez.

Este sistema es especialmente interesante en el caso de poblaciones en las que se sabe que ha existido migración, ya que la construcción de árboles taxonómicos contradice los principios de reconstrucción de filogenias (Felsenstein 1982). Esta situación se encuentra con frecuencia en razas o poblaciones que pertenecen a la misma especie, como son los estudios de poblaciones humanas (Saha y Tay, 1992; Ayala y col., 1994; Saha y col., 1995; Bosch y col., 1997; Jorde y col., 1997) o en estudios de especies domésticas (Grosclaude y col., 1990; MacHaugh y col., 1997; Cybron y col., 1999; Yang y col., 1999; Hanslik y col., 2000; Wimmers y col., 2000).

### II.8.8. Asignación racial.

El alto nivel de polimorfismo mostrado por los microsatélites ha permitido la utilización de los genotipos de los animales para determinar su población de origen (Waser & Strobeck, 1998; Davies y col., 1999). Este tipo de procedimientos ha sido utilizado con diferentes objetivos, tales como detectar la demarcación de

determinadas poblaciones (Paetkau y col, 1995; MacHugh y col., 1998; Primmer y col., 1999; Roques y col., 1999; Bjornstad & Roed, 2001), comparar los niveles de dispersión sexual (Favre y col., 1997), investigar las rutas migratorias y los hábitat de invierno de algunas aves desde diferentes áreas de cría (Haig y col., 1997), con propósitos forenses (Primmer y col., 2000), y también podrían ser utilizados para examinar la procedencia de productos de origen animal que se comercializan en diferentes mercados, o lo que es lo mismo *trazar* su origen, especialmente en el mercado actual, donde la calidad en muchas ocasiones va asociada al nombre de una determinada raza.

Para la investigación de la población de origen de la muestra anónima es esencial cuantificar la diferenciación racial. Se han desarrollado diversos métodos que podemos clasificar en dos categorías: la primera categoría agrupa a los "métodos generales", los cuales pueden ser aplicados a cualquier tipo de datos, e incluyen el análisis discriminante y el método de redes neuronales, que han sido usados y comparados por Taylor y col. (1994) y Cornuet y col. (1996), con resultados contradictorios. La segunda categoría incluye los métodos genéticos, los cuales solo pueden ser aplicados a los datos genotípicos (Paetkau y col., 1995; Favre y col., 1997); Rannala y Mountain 1997). Todos están basados en el cómputo y comparación de la verosimilitud con que el genotipo de un individuo puede ocurrir en cualquiera de los dos o más taxones candidatos. Estos métodos han probado ser efectivos (Waser y Strobeck, 1998), pese a que su eficacia recae sobre dos asunciones no siempre fácilmente asumibles: los loci deben estar en equilibrio Hardy\_Weinberg y en equilibrio de ligamiento.

Un último método de asignación está basado en las distancias genéticas entre un individuo y una población, en cuyo caso no son necesarias las asunciones de equilibrio aunque su eficiencia es menor que la de los métodos basados en verosimilitudes.

### **III. OBJETIVOS**

### **III. OBJETIVOS.**

Los objetivos de este trabajo han sido:

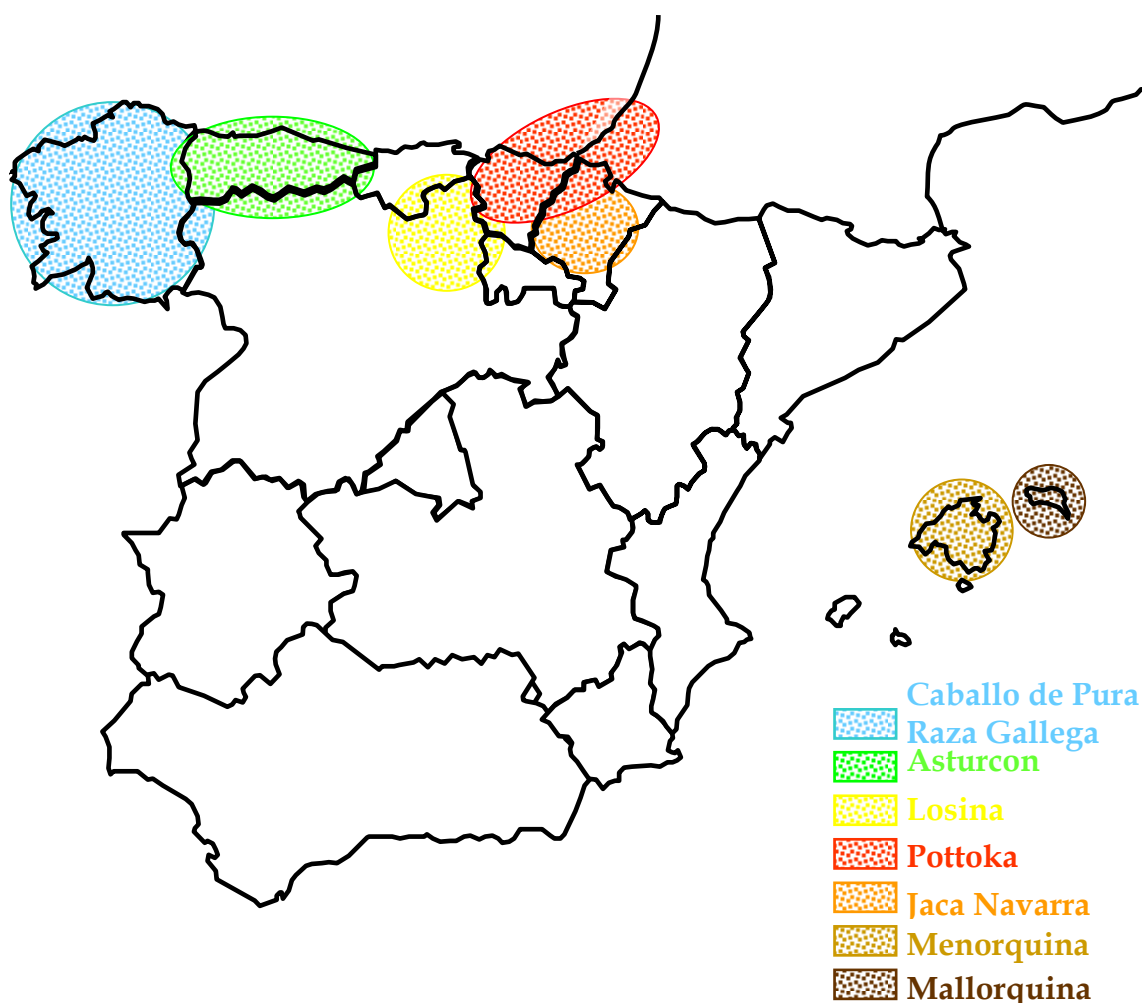
- 1.- Cuantificar y comparar los niveles de variabilidad genética en las razas analizadas.
- 2.- Estimar las relaciones genéticas entre las razas autóctonas españolas que están histórica- y geográficamente próximas.
- 3.- Valorar la capacidad del conjunto de microsatélites empleado, como herramienta con la que poder asignar muestras anónimas a alguna de las razas analizadas en este estudio.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### IV.1. Muestreo de las razas incluidas en el estudio.

En este estudio se han analizado un total de 540 animales pertenecientes a ocho razas diferentes (Figura 4.1.), cinco de las cuales se encuentran dispersas por diversas zonas del norte de la península (Asturcón (AST), Losina (LOS), Pottoka (PT), Caballo de Pura Raza Gallega (CG) y Jaca Navarra (JN)), dos pertenecen al archipiélago balear (Mallorquina (MAL) y Menorquina (MEN)), y una última raza, que se ha introducido como grupo de referencia (*outgroup*) (Pura Sangre Inglés (PSI)).



**Figura 4.1.:** Localización geográfica de las razas analizadas en este estudio.

En la Tabla 4.1. aparecen los datos del número de animales analizados por raza, el censo aproximado actual de cada raza, y la existencia o no de un Libro Genealógico de cada una de ellas.

**Tabla 4.1.:** Raza, origen geográfico, censo actual de la población, y existencia y fecha de creación del Libro Genealógico.

Raza	Origen Geográfico	Número de animales muestreados	Censo de la Población	Existencia de Libro Genealógico (Año de Creación)
Caballo de Pura Raza Gallega	Galicia	72	10000-100000	Sí (1998)
Asturcón	Asturias	119	750	Sí (1981)
	ICONA	61		
	Borines	40		
	La Vita	18		
Losina	Burgos	65	200	Sí (1998)
Pottoka	País Vasco	51	<1000	Sí (1995)
Jaca Navarra	Navarra	122	375	Sí (2001)
Mallorquina	Mallorca	20	200	Sí (1993)
Menorquina	Menorca	31	1000	Sí (1994)
Pura Sangre Inglés		60		

En el caso de la Raza Asturcón la toma de muestras se hizo a partir de tres núcleos aislados reproductivamente en las últimas generaciones, denominados por la zona geográfica a la que corresponden (Borines y La Vita), y por el nombre del organismo que las gestionaba (ICONA).

En el caso del Caballo de Pura Raza Gallega, las muestras analizadas corresponden a tres zonas geográficas diferentes, Pontevedra, La Coruña y Lugo.

Las muestras de la raza Losina, provienen de un solo núcleo geográfico, enclavado en la localidad de Pancorbo, y gestionado por un solo criador.

Las muestras de la raza Jaca Navarra pertenecen a ocho criadores diferentes que se asientan en 6 localidades: 60 muestras de Sabaiza, donde reside un núcleo de



conservación y referencia perteneciente al Gobierno de Navarra, 9 muestras de Beinza-Labayen, 4 muestras de Mendigorriá, 13 muestras de Iturgoyen, 30 muestras de Vidaurre, y 5 muestras de Osácar.

Las muestras de las razas Pottoka, Mallorquina y Menorquina, y la Raza Pura Sangre Inglés, fueron cedidas por el Laboratorio de Grupos Sanguíneos, sección de ADN, de la Unidad de Cría Caballar en Córdoba. En el caso de las muestras de Pottoka, corresponden a cinco localidades diferentes: Amorebieta (5), Berango (12), Encartada (9), Pagoeta (13), y Sollube (12).

## **IV.2. Metodología laboratorial para el genotipado de los animales.**

### IV.2.1. Extracción de ADN a partir de las muestras biológicas individuales.

El material biológico estudiado en todos los animales que componen el estudio fue sangre entera recogida en un medio conservante.

Partiendo de sangre se realizó una extracción del ADN contenido en los leucocitos, siguiendo un método de extracción conocido como “*salting out*” (Miller y col., 1988) descrito en la Tabla 4.2. y 4.3.

**Tabla 4.2.:** Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de sangre.

- 
- 1.- Mezclar por inversión 1,5 ml de sangre entera + 1 vol. (TKM1 + Nonidet P-40).
  - 2.- Dejar en hielo 10 minutos mezclando ocasionalmente.
  - 3.- Centrifugar a 800 g durante 15 minutos.
  - 4.- Retirar el sobrenadante reteniendo el sedimento.
  - 5.- Añadir 4 ml de TKM1 al sedimento. Lavar y resuspender el sedimento por inversión o vortex ligero.
  - 6.- Centrifugar a 800 g durante 10 minutos.
  - 7.- Retirar el sobrenadante reteniendo el sedimento.
  - 8.- Repetir los pasos 5 a 7 hasta que no se observe hemoglobina en el sedimento.
  - 9.- Resuspender el sedimento en 1,8 ml de tampón B.
  - 10.- Añadir Proteinasa K (0,3 mg/ml)
  - 11.- Mezclar por inversión durante 15-30 segundos.
-

- 12.- Añadir 250 µl de SDS 10%.
- 13.- Mezclar por inversión.
- 14.- Incubar a 51 °C 2-3 horas.
- 15.- Añadir 1 ml de NaCl 5 M
- 16.- Mezclar con fuerza durante 15-30 segundos para que precipiten las proteínas.
- 17.- Centrifugar 15-20 minutos a 5000 rpm.
- 18.- Recoger el sobrenadante por inversión en un tubo pirex.
- 19.- Añadir 2,5 vol. de etanol 100% a -20 °C.
- 20.- Mezclar suavemente por inversión hasta que precipite el ovillo de ADN.
- 21.- Recoger el ovillo y lavarlo con etanol 70% a -20°C.
- 22.- Dejar secar al aire
- 23.- Resuspender en 200 µl de agua autoclavada.

**Tabla 4.3. :** Composición química de los tampones empleados en la extracción de ADN.

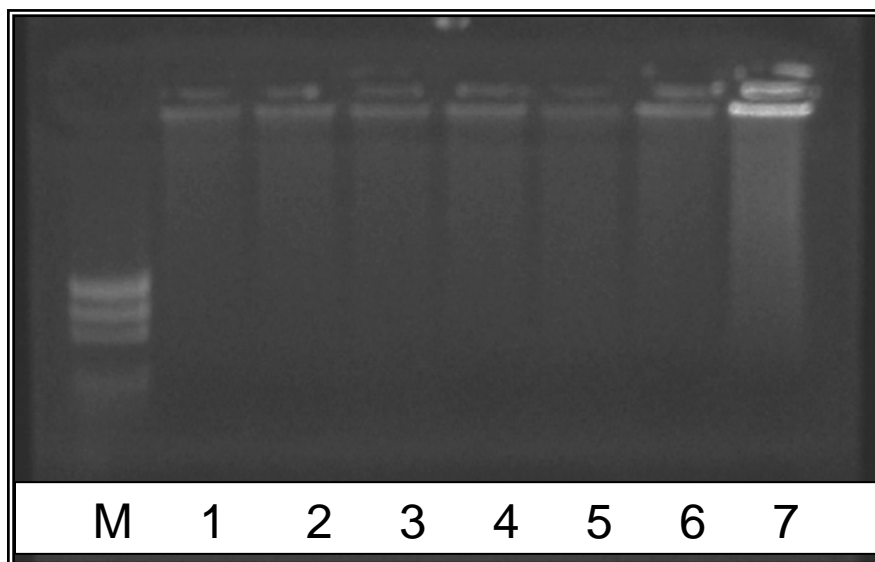
<b>TAMPÓN TKM1 + NONIDET P-40</b>	<b>TAMPÓN B</b>
10 mM Tris-HCl (ph 7,5)	10 mM Tris-HCl (ph 7,5)
10 mM kCl	25 mM EDTA (ph 8,0)
10 mM MgCl <sub>2</sub>	75 mM NaCl
2 mM EDTA (ph 8,0)	
NonidetP-40 2,5%	

El ADN obtenido de cada animal se cuantificó por espectrometría y se valoró su calidad midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda.

Los ADNs que presentaron índices de densidad óptica 260/280 nm entre 1,7 y 1,9 se llevaron a una concentración final de 100 ng/µl. Estas alícuotas se almacenaron a 4 °C, y las soluciones madre se conservaron a -20 °C.

También se evaluó el estado del ADN (calidad) por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (Agarosa Estándar Media, Ecogen), con TBE 1X (Tris-HCl 90mM, Ácido Bórico 90mM, EDTA 2mM, pH=8) teñidos con Bromuro de etidio

siguiendo protocolos estándar (Sambrook y col., 1989). Las muestras de ADN se mezclaron con tampón de carga (Azul de Bromofenol 0,25%, Sacarosa 40%) (Sambrook y col., 1989) y se cargaron en cubetas horizontales submarinas (Figura 4.2.). La electroforesis se realizó con voltaje constante a 80 voltios durante una hora.



**Figura 4.2.:** Gel de agarosa al 0,8% en el que se han sometido a electroforesis en la calle 1: Marcador molecular de tamaño y en las calles 2 a 8 aproximadamente 2  $\mu$ l del ADN genómico extraído y resuspendido.

La calidad de las muestras se aceptó como válida cuando no se detectó presencia de ARN, y el ADN genómico aparecía íntegro, sin fragmentar, definido como una única banda.

#### IV.2.2. Selección de los marcadores genéticos empleados para el genotipado.

Los marcadores de elección para el estudio fueron los de tipo II o microsatélites. De entre todos los descritos hasta el momento del estudio se eligieron aquellos que formaban parte del panel de referencia del ISAG y que habían acreditado reunir unas cualidades óptimas para los objetivos del trabajo: segregación mendeliana, polimorfismo elevado, fácilmente abordables en el laboratorio y consensuados a nivel internacional. La batería de 13 microsatélites seleccionados incluye los descritos en la Tabla 4.4. y su posición cromosómica en los Anexos 14 a 21.

En todos los casos se trata de microsatélites de tipo dinucleótido, con motivos de repetición homogénea (TG).

**Tabla 4.4.:** Microsatélites empleados para el análisis de las razas estudiadas, referencias bibliográficas y cebadores empleados para su amplificación.

Locus	Secuencias de los cebadores (5'-3')	Locus	Secuencias de los cebadores (5'-3')
HTG4 Ellegren y col. (1992)	CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC	HMS6 Guérin y col. (1994)	GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG CTCCATCTTGTGAAGTGTAAGTCA
HTG6 Ellegren y col. (1992)	CCTGCTTGAGGCTGTGATAAGAT GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT	HMS7 Guérin y col. (1994)	CAGGAACTCATGTTGATACCATC TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT
HTG7 Marklund y col. (1994)	CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	ASB2 Breen y col. (1997)	CCTTCCTGTAGTTTAAGCTTCTG CACAACTGAGTTCTCTGATAGG
HTG8 Marklund y col. (1994)	CAGGCCGTAGATGACTACCAATGA TTTTCAGAGTTAATTGGTATCACA	AHT4 Binns y col. (1995)	AACCGCCTGAGCAAGGAAGT CCCAGAGAGTTTACCCT
HTG10 Marklund y col. (1994)	CAATTCCTCGCCCAACCCCGGCA TTTTTATTCTGATCTGTACATTT	AHT5 Binns y col. (1995)	ACGGACACATCCCTGCCTGC GCAGGCTAAGGGGGCTCAGC
HMS2 Guérin y col. (1994)	ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG CTTGCAGTCGAATGTGTATTAAATG	VHL20 Van Haeringen y col. (1994)	CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG
HMS3 Guérin y col. (1994)	CCAACTCTTTGTCACATAACAAGA CCATCCTCACTTTTCACTTTGTT		

#### IV.2.2.a. Amplificación por PCR de los microsatélites seleccionados.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando un termociclador automático (PTC-200, MJ Research).

El volumen final de amplificación se optimizó para 10 µl y una composición de: ADN 50 ng; 5 µM de cebadores; 200 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Pharmacia); 50 mM KCl; 1,5 a 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM Tris-HCl (pH 9,0) y 0,3 U Tfl

ADN polimerasa (Epicentre Technologies, Madison, WI 53713, EE.UU.). El resto de condiciones de amplificación aparecen en la Tabla 4.5..

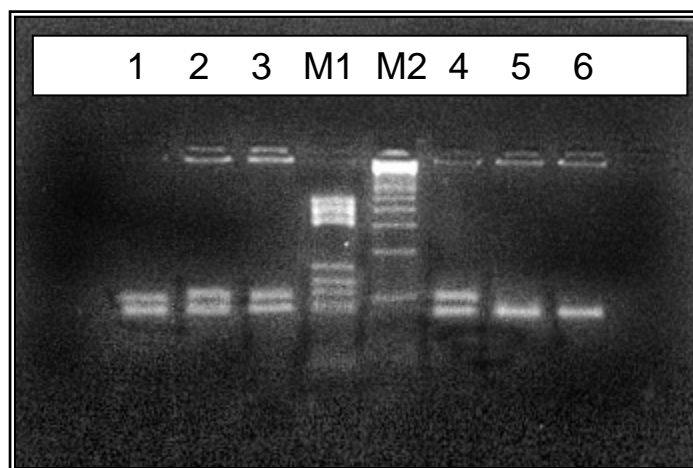
**Tabla 4.5.:** Condiciones laborales empleadas para la amplificación de los microsatélites: temperatura de hibridación, concentración de cloruro de magnesio y número de ciclos de amplificación. Tamaño del producto amplificado.

Locus	Tm	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Ciclos	Tamaño del amplicón
HTG-4	55	2.5	30	129-141
HTG-6	55	2.5	30	84-106
HTG-7	55	2.5	30	118-128
HTG-8	55	2.5	30	176-192
HTG10	55	2.5	30	94-114
HMS-2	60	2.5	35	216-238
HMS-3	60	2.5	30	150-172
HMS-6	60	2.5	35	159-173
HMS-7	60	2.5	30	170-186
ASB-2	60	2.5	30	154-188
AHT-4	60	2	30	148-164
AHT-5	60	1.5	30	128-142
VHL20	60	2.5	30	87-105

Los programas de amplificación siguieron la estructura clásica:

- Paso 1: desnaturalización inicial 95 °C 3 minutos.
- 30 a 35 ciclos que incluyen los pasos 2 a 5:
- Paso 2: desnaturalización 95 °C 45 segundos.
- Paso 2: hibridación 55-60 °C 45 segundos.
- Paso 3: hibridación 72 °C 45 segundos.
- Paso 4: extensión final 72°C 10 minutos.

El producto final amplificado se chequeó en un gel de agarosa (Figura 4.3.), para comprobar su especificidad y si presentaba un tamaño acorde al descrito en la bibliografía.



**Figura 4.3.:** Imagen de un gel de agarosa. Carreras 1-6, individuos amplificados para el microsatélite HTG8. M1 y M2, marcadores de tamaño.

#### IV.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida del producto amplificado.

El producto amplificado se sometió a electroforesis vertical en geles de poliacrilamida. Este tipo de geles presentan las ventajas con respecto a los de agarosa de que poseen un mayor poder de resolución y su entramado más fino permite discriminar más claramente hasta diferencias de un nucleótido. Las condiciones de electroforesis fueron desnaturalizantes y para ello se elaboraron geles que contenían urea. La composición de estos geles aparece descrita en la Tabla 4.6..

**Tabla 4.6.:** Concentración de los reactivos empleados en la elaboración de los geles de poliacrilamida.

---

Acrilamida-bis-acrilamida (19:1) 8%

Urea 7 M

Tampón TBE 0,5 X (Tris-HCl 45mM, Ácido Bórico 45mM, EDTA 1mM, pH=8)

TEMED\* 0,2%.

Persulfato amónico 0,7%

---

Debido al mínimo grosor de los geles (0,35 mm) fue necesario tratar previamente los cristales con dos productos Bind Silane (Pharmacia) y Repel

(Pharmacia), que permitían manejar el gel de poliacrilamida adherido al cristal tratado con Bind Silane.

El producto amplificado, previamente desnaturalizado a 95 °C durante cinco minutos y diluido en una solución tampón de carga, que mantiene las condiciones desnaturalizantes y aporta densidad y color a la muestra (Tabla 4.7.), se cargó en los geles de poliacrilamida.

**Tabla 4.7.:** Composición del tampón de carga del producto amplificado en los geles de poliacrilamida.

EDTA 5,5Mm; pH=8
Xilén-cianol, 0,05%
Azul de bromofenol, 0,005% /
Formamida desionizada

Las condiciones de migración electroforética fueron las siguientes: 1500-2000 Voltios, 15 Watios y 60 MiliAmperios, a una temperatura de 60 °C, durante un tiempo que varió entre las dos y cuatro horas, dependiendo del tamaño del amplicón.

Para poder visualizar el producto amplificado tras la electroforesis, los geles se tiñeron siguiendo el protocolo descrito por Bassam y col. (1991), con modificaciones, que aparece en la Tabla 4.8..

**Tabla 4.8.:** Protocolo de teñido con nitrato de plata de los geles de poliacrilamida.

- 1.- **FIJACIÓN** del ADN al gel: bañar el gel en una solución de ácido acético al 10% durante 2 minutos.
- 2.- Eliminar los restos de ácido acético con un lavado con agua MilliQ.
- 3.- **TINCIÓN**: bañar el gel en una solución de AgNO<sub>3</sub> 0,1% y formaldehído al 37%, durante 15 minutos.
- 4.- Eliminar los restos de AgNO<sub>3</sub> con un lavado con agua MilliQ.
- 5.- **REVELADO**: bañar el gel en una solución de Carbonato sódico, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,07M; tiosulfato sódico, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O al 1% y formaldehído al 37%, hasta obtener la imagen esperada.
- 6.- Eliminar los restos de carbonato sódico mediante lavado con agua MilliQ.

---

7.- **PARO:** Paro del revelado, añadiendo una solución de ácido acético al 10% conservada a 4°C.

8.- Eliminar los restos de ácido acético mediante lavado con agua MilliQ.

9.- **CONSERVACIÓN:** bañar el gel en una solución de agua y glicerol al 10%.

---

#### IV.2.4. Genotipado de los animales.

De forma simultánea a la electroforesis de las muestras a genotipar se carga un marcador de tamaño (plásmido pBR cortado con HaeIII) el cual ofrece un patrón de bandas muy adecuado para extrapolar el tamaño en pares de bases, de las bandas amplificadas de los microsatélites. Al mismo tiempo y en todos los geles se incluyeron un mínimo de dos individuos de referencia genotipados inicialmente y que permiten conectar todos los geles y evidenciar cualquier problema de migración durante la electroforesis.

Como medidas de control adicionales para minimizar los errores de genotipado se repitieron las imágenes dudosas y se hicieron réplicas de individuos tomados aleatoriamente.

### **IV.3. Análisis estadístico de los resultados.**

#### IV.3.1. Estimación de parámetros indicativos de la variabilidad genética dentro de poblaciones.

##### IV.3.1.a. Cálculo de las frecuencias alélicas.

Una vez conocido el genotipo de cada uno de los animales muestreados que intervienen en este estudio se calcularon las frecuencias alélicas de cada microsatélite en todas las razas. Este cálculo se realizó aplicando la siguiente fórmula por medio del programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1981):

$$P_{ijk} = 2(n_{ii} + n_i) / 2N$$

donde  $P_{ijk}$  es la frecuencia del alelo  $i$  dentro de la población  $k$  para el locus  $j$ ,  $n_{ii}$  es el número de animales heterocigotos para el alelo  $i$ ,  $n_i$  es el número de animales homocigotos para el alelo  $i$  y  $N$  es el número total de animales genotipados para el locus  $j$ .



El número medio de alelos (NMA) encontrado en la muestra completa de cada raza, y en una muestra reducida de cada una, establecida con el fin de evitar cualquier correlación entre el tamaño de la muestra y el número de alelos, se calcularon por medio del programa BIOSYS.

#### *IV.3.1.a.1. Distribución de las frecuencias alélicas.*

Las frecuencias alélicas de cada microsatélite y raza se representan gráficamente por medio de unos histogramas, elaborados con una hoja de cálculo del programa EXCEL® (Microsoft).

También se representan por medio de histogramas (EXCEL®, Microsoft), la distribución de las frecuencias alélicas medias de todas las poblaciones.

Un análisis paralelo consistió en comparar la distribución de las frecuencias alélicas entre una población reducida de las razas distribuidas por la zona norte de la península, razas atlánticas (25 animales por raza = 125 animales), y los 45 animales de las razas distribuidas por las islas de Mallorca y Menorca, razas mediterráneas.

#### *IV.3.1.b. Heterocigosis.*

Las *heterocigosis esperada* ( $H_e$ ) y *observada* ( $H_o$ ) se calcularon mediante el programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1981).

La  $H_o$  para un locus  $j$  es la proporción entre el número de animales heterocigotos observados y el número total de genotipos para ese locus.

La *diversidad génica o heterocigosis esperada* ( $H_e$ ), para cada raza, se ha calculado por locus,  $j$ , mediante el siguiente estimador:

$$H_{e_j} = \frac{2n \left( 1 - \sum_{i=1}^r \bar{x}_{ij}^2 \right)}{2n-1}$$

donde  $n$  es el número total de individuos muestreados,  $r$  es el número de alelos del locus  $j$  y  $x_{ij}$  la frecuencia ponderada del alelo  $i$  del locus  $j$ .

La heterocigosis total esperada ( $H_T$ ), es el promedio de las  $He_j$  de todos los  $R$  loci analizados:

$$H_T = \frac{\sum_{j=1}^R He_j}{R}$$

La  $He$  para cada locus  $j$  en el conjunto de la población, se calculó a partir del siguiente estimador:

$$He = \frac{2n \left( 1 - \sum_{i=1}^r x_{ijp}^2 \right)}{2n-1}$$

donde  $n$  es el número de individuos muestreados en la población  $p$ ,  $r$  es el número de alelos del locus  $j$  y  $x_{ijp}$  es la frecuencia del alelo  $i$  del locus  $j$  en la población  $p$ .

La  $H_T$  para cada población, se calculó promediando sobre todos los loci sus  $He$  respectivas.

#### IV.3.1.c. Equilibrio Hardy-Weinberg.

Buscando la asociación que pudiera existir entre los dos alelos que un individuo recibe para un locus específico y el posible efecto que puedan tener algunas fuerzas, como la mutación, selección, migración, subdivisión de poblaciones (efecto Wahlund), etc., sobre las frecuencias alélicas en el tiempo, se utilizaron dos procedimientos que estiman la existencia de equilibrio Hardy-Weinberg en las poblaciones estudiadas:

- a) para cada locus/población siguiendo el algoritmo de cadenas de Markov (Guo y Thompson, 1992) incluido en el paquete GENEPOP versión 3.1 (Raymond y Rousset, 1995).
- b) para cada una de las combinaciones loci/población mediante un test ji-cuadrado siguiendo el método de Fisher, (Raymond y Rousset, 1995), siendo:

$$\chi^2 = -2 \left( \sum_{i=1}^r \ln P_i \right)$$

donde  $r$  es el número total de loci en cada raza y  $P_i$  es el valor de  $P$  para el locus  $i$  en dicha raza (Raymond y Rousset, 1995), por medio del programa BIOSYS.

#### IV.3.1.d Estimación de un episodio reciente de cuello de botella.

Se han descrito diversos métodos que permiten conocer si una población ha atravesado recientemente un cuello de botella, pero quizá uno de los más sencillos es el descrito por Luikart y col., (1998), llevado a cabo en este estudio.

Se trata de un método gráfico consistente en agrupar los alelos de al menos 5 loci en 10 categorías de frecuencias alélicas, y crear un histograma con ellas. Las 10 categorías son: 0,001-0,100, 0,101-0,200, 0,201-0,300, etc. Se definen como frecuencias alélicas bajas, las incluidas en el rango 0,001-0,100, frecuencias alélicas medias, 0,101-0,900, y frecuencias alélicas altas, 0,901-1,000. El método gráfico concluye que una población ha atravesado recientemente un cuello de botella si las observaciones encontradas dentro de la categoría de frecuencias alélicas bajas es menor que una o más de las observaciones encontradas en las frecuencias alélicas intermedias.

Adicionalmente se ha realizado otro test descrito por Cornuet y Luikart (1996), considerando que cuando una población experimenta una reducción en su tamaño efectivo, generalmente se desarrolla un exceso de la heterocigosis observada en contraposición a la esperada en una población en equilibrio, que persiste sólo un cierto número de generaciones hasta alcanzar de nuevo el equilibrio. Este exceso de heterocigosis observada, se debe al hecho de que cuando se produce un descenso en el tamaño efectivo de la población lo primero que se reduce son los alelos que presentaban una baja frecuencia, y que realmente contribuían de una forma muy pequeña a la heterocigosis.

Tanto el test descrito por Luikart como el de Cornuet, se han calculado por medio del programa Bottleneck (Piry y col., 1999).

#### IV.3.2. Análisis de la diferenciación genética entre poblaciones.

##### IV.3.2.a. Test de diferenciación génica por pares de poblaciones y sobre el total de las razas.

Por medio del programa GENEPOP versión 3.1 (Raymond y Rousset, 1995) se ha llevado a cabo un análisis de diferenciación génica de las poblaciones incluidas en el estudio. El análisis se ha realizado considerando pares de poblaciones y el total de las mismas.

Se ha calculado por locus el test exacto de Fisher descrito por Raymond y Rousset (1995), adoptando como hipótesis nula  $H_0$  que la distribución alélica a través de las poblaciones es idéntica.

##### IV.3.2.b. Cálculo de los estadístico $F$ de Wright.

La estimación de estos parámetros, se llevó a cabo mediante el programa FSTAT (Goudet, 1995). Para contrastar las hipótesis nulas  $F_{IS}=0$ ,  $F_{IT}=0$  y  $F_{ST}=0$ , se utilizó un test de permutaciones aleatorias. La desviación típica se obtuvo mediante el procedimiento de remuestreo bootstrap (1500 iteraciones) (Weir, 1990).

$$\chi^2_{[(r-1)(s-1)]} = 2nF_{ST}(r-1)$$

El nivel de significación de  $F_{ST}$  se calculó mediante el estadístico ji-cuadrado de Workman & Niswander (1970) donde  $n$  es el tamaño de la muestra,  $r$  es el número de alelos,  $s$  es el número de poblaciones y  $(r-1)(s-1)$  los grados de libertad.

##### IV.3.2.c. Cálculo del coeficiente de diferenciación génica ( $G_{ST}$ )

Los valores de  $G_{ST}$  se estimaron por medio del programa DISPAN (Ota T, 1993).

$$G_{ST} = D_{ST}/H_T$$

##### IV.3.2.c. Análisis filogenético.

###### IV.3.2.c.1. Estima de distancias genéticas entre poblaciones.

Se estimaron dos tipos de distancias genéticas entre pares de poblaciones. De entre todas las posibilidades se seleccionaron dos de las que mejor se adaptan al tipo

de información estudiada. La primera de ellas es la que se conoce como distancia  $D_a$  de Nei (1983), y la siguiente es la medida  $F_{ST}$  (Wright, 1965).

En el primer caso se calculó por medio del programa DISPAN, y en el segundo por el programa GENEPOP.

Ambas medidas, son ideales en el caso de poblaciones genéticamente muy próximas, y por tanto que no divergieron hace mucho tiempo, donde la causa fundamental de la diferenciación proviene de la deriva genética.

El número de migrantes máximo que se puede establecer entre un par de poblaciones sin que se altere la distancia genética existente entre ambas, fue calculado por el programa GENEPOP partiendo de la fórmula:

$$Nm = \frac{1}{4} \left( \frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$$

La correlación entre las dos matrices de distancias genéticas obtenidas, se calculó por medio de una hoja de cálculo del programa EXCEL® (Microsoft).

La matriz de correlaciones entre los valores de  $F_{ST}$  de cada microsatélite se calculó por medio de una hoja de cálculo del programa EXCEL® (Microsoft).

#### IV.3.2.c.2. Construcción de árboles filogenéticos.

Las matrices de distancias genéticas generadas se utilizaron para construir los árboles filogenéticos consecuentes al aplicar el método UPGMA (*Unweighted pair group method using arithmetic averages*) (Sneath and Sokal, 1973) para la reconstrucción de filogenias.

En el caso de la distancia  $D_a$ , el programa DISPAN sirvió para elaborar el árbol filogenético, y además se calculó la verosimilitud de las ramas por medio del método de remuestreo bootstrap (Weir, 1990), aplicando 1000 réplicas.

El árbol generado a partir de la matriz de distancias  $F_{ST}$  se construyó utilizando el programa MEGA (Sudhir y col., 2001).

IV.3.2.d. Medidas de similitud entre individuos.

El hecho de que los microsatélites presenten un nivel tan alto de polimorfismo hace que sean capaces de diferenciar los individuos dentro y entre poblaciones, lo que permite que puedan ser tratados como unidades taxonómicas operacionales individuales (OTUs).

En este sentido se ha aplicado la fórmula Bowcock y col., 1994, que se basa en la proporción de alelos compartidos.

Los datos empleados para este estudio comprenden una total de 262 animales seleccionados aleatoriamente, repartidos del siguiente modo: Asturcón (67), Jaca Navarra (25), Losina (25), Caballo de Pura Raza Gallega (50), Pottoka (25), Pura Sangre Inglés (25), Menorquina (25) y Mallorquina (20).

La matriz de distancias generada se trató con el método UPGMA y se construyó un árbol de distancias por medio del programa MEGA.

IV.3.2.e. Análisis de Correspondencia.

El análisis de correspondencia es un análisis de componentes principales aplicado a variables cualitativas que, al no poder utilizar correlaciones, se basa en la distancia no euclídea del  $\chi^2$ . Con él es posible no sólo detectar si existe alguna relación significativa entre dos o más variables cualitativas, sino que dentro de ellas detecta cuales son las categorías entre las que existe asociación.

Mediante el análisis de correspondencia se ha condensado la información de un gran número de alelos y loci en un menor número de variables sintéticas o factores, con el objetivo de estimar cuales son las relaciones genéticas entre las razas del estudio.

Por medio de un número reducido de factores, generalmente dos o tres, es posible explicar gran parte de la inercia de las categorías de las variables que contribuyen en mayor medida al reparto de la diversidad.

Partiendo de la tabla de genotipos y aplicando el programa GENETIX (Belkhir y col., 1996) se han calculado los valores de inercia atribuibles a los tres primeros factores, así como la contribución de cada una de las razas a la inercia de cada factor,

y los alelos más importantes en cuanto a su contribución a la inercia de los tres principales factores. Las representaciones gráficas de las poblaciones dentro de los ejes principales también se generaron a partir del programa informático GENETIX.

#### IV.3.2.f. Asignación racial.

Con el objetivo de asignar individuos anónimos a poblaciones se desarrollaron 3 procedimientos diferentes utilizando el programa GENECLASS (Cornuet y col., 1999).

Para los tres métodos se calculó una asignación directa a la población más probable.

##### *IV.3.2.f.1. Métodos basados en frecuencias.*

El primer método es el denominado método de frecuencias (Paetkau y col., 1995), el cual asigna un individuo a la población en la que el genotipo del individuo puede ocurrir con mayor probabilidad. Se suponen  $J$  loci independientes tipados en las  $I$  poblaciones de referencia y en los individuos anónimos. La frecuencia del alelo  $k$  del locus  $j$  en la población  $i$  es  $p_{ijk}$ . Asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg, la probabilidad de que el genotipo  $A_kA_{k'}$  ocurra en la población  $I$  es igual a  $(p_{ijk})^2$  si  $k=k'$  y del locus  $j$  es  $2p_{ijk}p_{ijk'}$  si  $k \neq k'$ .

Desde el momento que se suponen  $J$  loci independientes, la probabilidad de que ocurra un genotipo multilocus en una población dada es el producto de las probabilidades de cada locus.

Para evitar que una población quede excluida por no ser portadora de alguno de los alelos de los individuos anónimos, se decidió reemplazar las frecuencias nulas por un pequeño valor constante (0,01).

##### *IV.3.2.f.2. Métodos Bayesianos.*

El segundo método es el denominado método Bayesiano, inspirado por Rannala y Mountain (1997), el cual asume una densidad de probabilidades a priori igual, para las frecuencias alélicas de cualquier locus en cualquier población. La probabilidad marginal de observar un individuo con el genotipo  $A_kA_{k'}$  en el locus  $j$  en la población  $i$  equivale a:

$$\frac{(n_{ijk} + 1 / K_j + 1)(n_{ijk} + 1 / K_j)}{(n_{ij} + 2)(n_{ij} + 1)} \quad \text{si } k=k'$$

$$\frac{2(n_{ijk} + 1 / k_j)(n_{ijk} + 1 / k_j)}{(n_{ij} + 2)(n_{ij} + 1)} \quad \text{si } k \neq k'$$

$n_{ijk}$  es el número de alelos  $k$  muestreados en el locus  $j$  de la población  $i$  (sin contar el individuo que debe ser asignado),  $n_{ij}$  es el número de copias de genes muestreadas para el locus  $j$  en la población  $i$   $n_{ij} = \sum_{k=1}^{k_j} n_{ijk}$  y  $k_j$  es el número total de alelos observados en el conjunto de poblaciones para el locus  $j$ .

#### IV.3.2.f.3. Métodos basados en distancias genéticas.

Et tercer método es el método basado en distancias, el cual asigna el individuo a la población más próxima. Este método requiere definir una distancia entre un individuo y una población. Se consideraron 6 distancias genéticas adaptadas al caso particular de enfrentar un individuo a una población: distancias de Nei (distancia Standard de Nei, distancia mínima de Nei y distancia  $DA$  de Nei), distancia cuerda de Cavalli-Sforza y Edwards, distancia  $(\delta\mu)^2$  de Goldstein, y  $D_{AS}$  (Chakraborty y Jin, 1993).



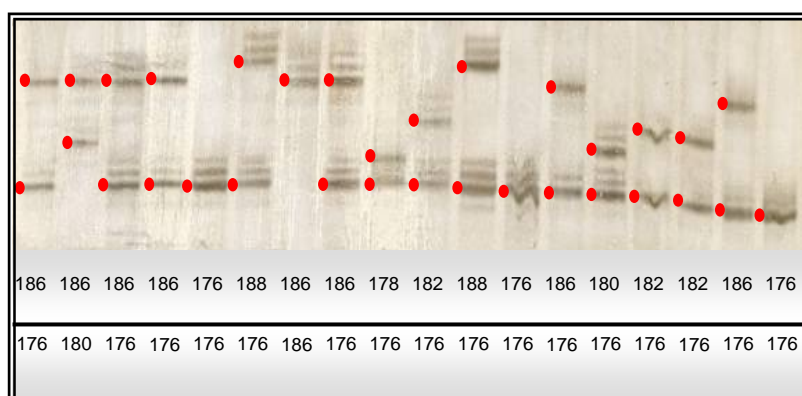
## **V. RESULTADOS**

## V. RESULTADOS

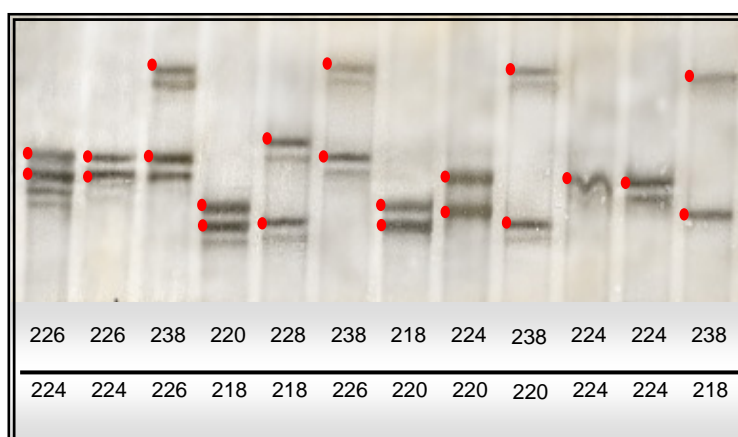
### V.1. Patrones de amplificación de los microsatélites.

Los microsatélites mostraron patrones de amplificación con diferentes niveles de complejidad atendiendo a la existencia de bandas sombra en mayor o menor número y a la presencia o no de la adenina adicional que se añade durante el proceso de extensión a los fragmentos amplificados (Figura 5.1. a 5.6.)

Los microsatélites con un patrón más sencillo fueron HTG8 y HMS2 (Figura 5.1. y 5.2.). En el caso del último, la complejidad es consecuencia de la longitud del amplicón, con una diferencia de 22 pb entre el alelo más largo y más corto. En los individuos heterocigotos para ambos alelos, el alelo más largo se vio perjudicado en su nivel de amplificación frente al más corto, y éste aparecía como una banda menos intensa.

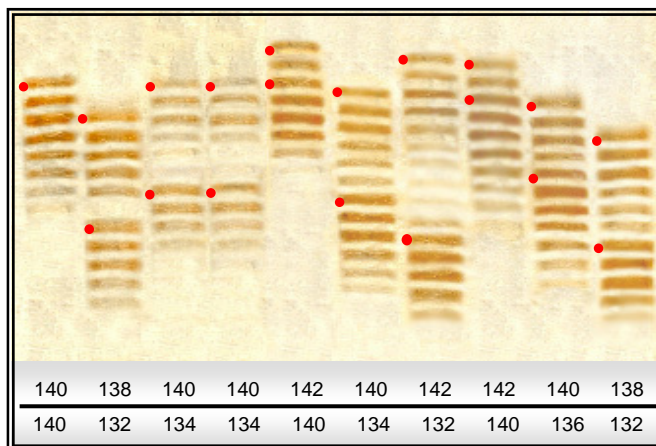


**Figura 5.1.:** Imagen del patrón de amplificación del microsatélite HTG8.



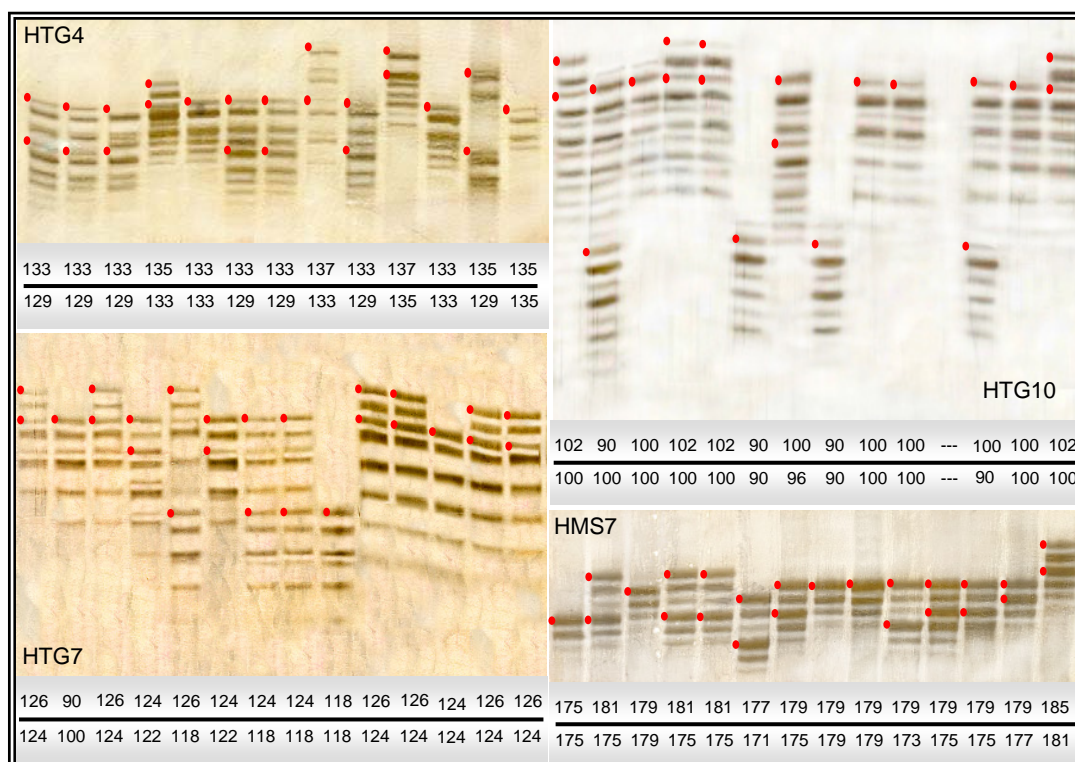
**Figura 5.2.:** Imagen del patrón de amplificación del microsatélite HMS2.

El microsatélite con el patrón de amplificación más complejo fue AHT5 (Figura 5.3.), que además de amplificar a una temperatura de hibridación superior a la del resto ( $T_m$  65 °C), se acompañaba de numerosas *bandas sombra*.



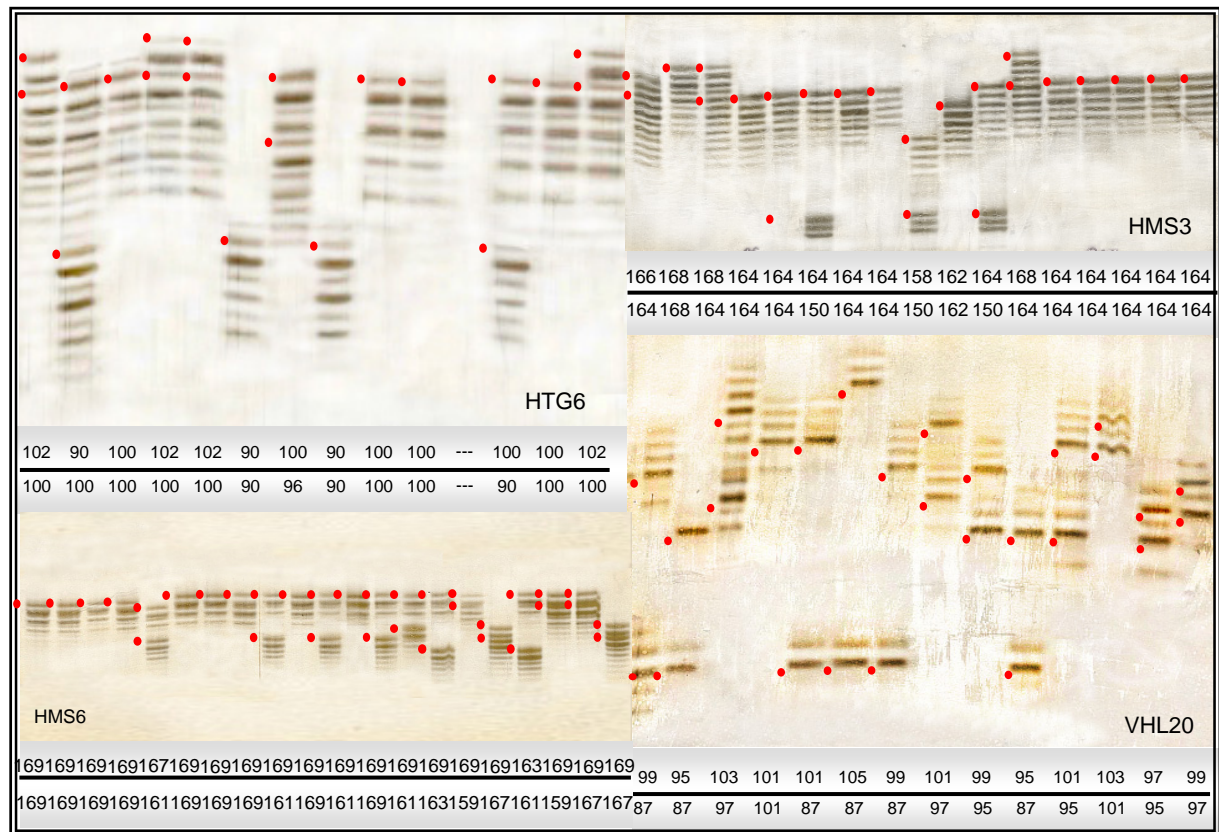
**Figura 5.3:** Imagen del patrón de amplificación del microsatélite AHT5.

El resto de microsatélites presentaron patrones de amplificación con niveles de complejidad intermedia entre los dos grupos anteriores.

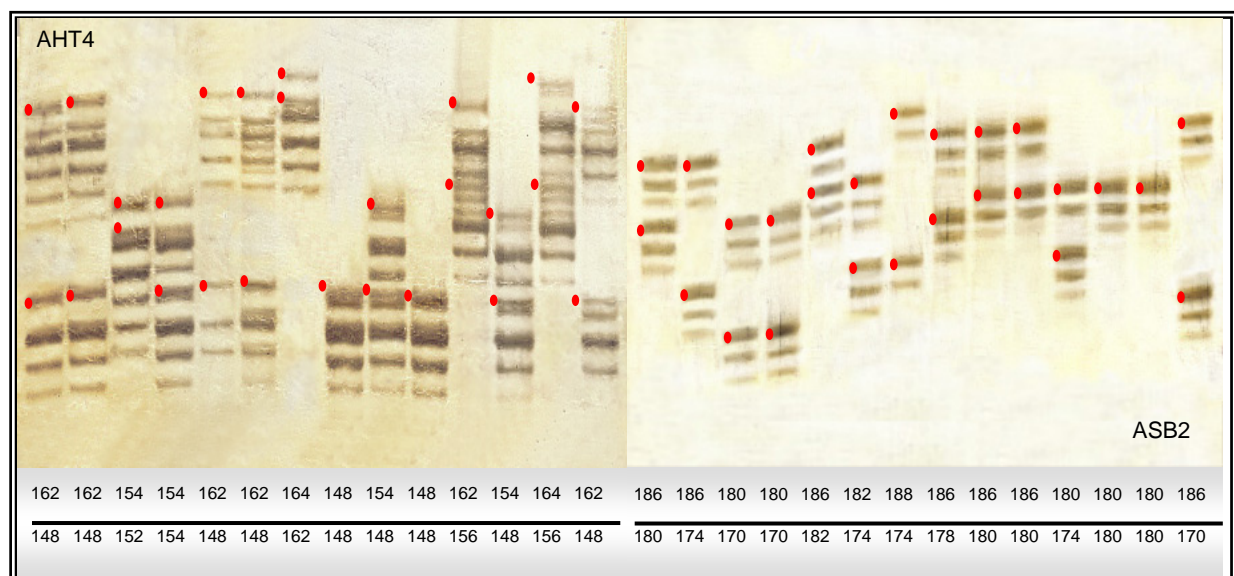


**Figura 5.4.:** Imágenes de los patrones de amplificación de los microsatélites HTG4, HTG7, HTG10 y HMS7.

**Figura 5.5.:** Imágenes de los patrones de amplificación de los microsátelites HTG6, HMS3, HMS6 y VHL20.



**Figura 5.6.:** Imágenes de los patrones de amplificación de los microsatélites AHT4 y ASB2.



## V.2. Estimación de parámetros indicativos de la variabilidad genética dentro de poblaciones.

El primer paso previo a cualquier cálculo fue conocer el genotipo de todos los individuos que participaron en el estudio para los 13 microsatélites analizados. Los alelos encontrados se genotiparon nombrándolos como el tamaño en pares de bases estimado a partir de individuos control y el marcador de tamaño empleado.

En la Tabla 5.1. aparece el número medio de alelos (NMA) encontrado en cada raza para cada uno de los microsatélites, el número total de alelos encontrado por locus y por población, y el rango alélico en pares de bases, hallado en todas las razas.

**Tabla 5.1.:** Número de alelos por microsatélite y por raza, número de alelos total por microsatélite y por raza, número medio de alelos por raza (NMA) con su error estándar calculado sobre el tamaño de muestra total y muestra reducida y rango alélico en pares de bases por microsatélite sobre todas las razas. En rojo aparecen los valores más altos y en azul los más bajos.

Locus	AST	JN	LOS	CG	PT	MEN	MAL	PSI	Total	Rango alélico
HTG4	6	6	6	6	6	6	6	6	7	129-141
HTG6	8	5	6	9	6	5	6	5	10	84-106
HTG7	4	5	4	5	4	4	3	4	6	118-128
HTG8	6	8	6	6	6	5	6	5	9	176-192
HTG10	9	10	8	10	9	8	9	7	11	94-114
HMS2	9	9	7	8	7	4	5	4	12	216-238
HMS3	7	9	7	8	8	5	8	6	10	150-172
HMS6	6	7	6	6	6	6	3	5	8	159-173
HMS7	7	8	6	9	7	7	7	5	9	170-186
ASB2	8	9	10	9	9	9	5	8	11	154-188
AHT4	8	8	7	9	7	8	8	4	9	148-164
AHT5	6	7	6	7	6	5	5	5	8	128-142
VHL20	8	10	9	9	10	8	7	4	10	87-105
NMA completo (error estándar)	7,1 (0,40)	7,8 (0,47)	6,8 (0,43)	7,8 (0,44)	7,0 (0,45)	6,2 (0,46)	6,1 (0,50)	5,2 (0,34)		
NMA reducido (error estándar)	5,7 (0,37)	6,0 (0,49)	5,7 (0,42)	6,6 (0,43)	6,7 (0,34)	5,8 (0,34)	6,0 (0,18)	4,6 (0,26)		
TOTAL	92	101	88	101	91	80	79	69	120	

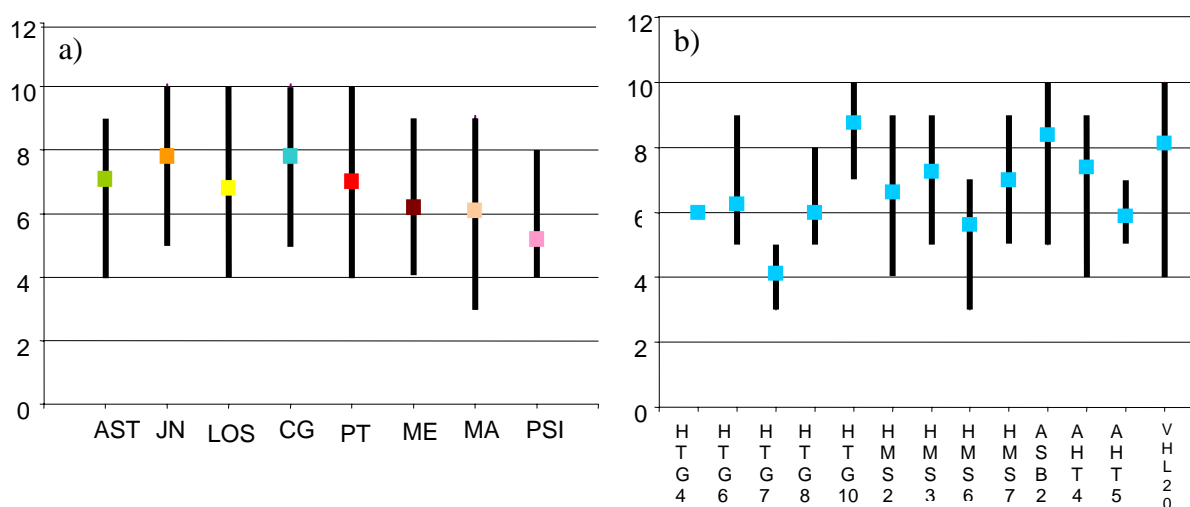


Entre todos los microsatélites estudiados se encontraron un total de 120 alelos diferentes. El microsatélite que presenta un mayor número de alelos diferentes es HMS2, con 12 alelos, y el que menos HTG7 con 6.

El hecho de contar con mayor número de alelos no significa tener un mayor rango alélico, ya que ASB2 tiene 18 posiciones posibles (154-188) y solo tiene 11 alelos, mientras que HMS2 presenta una alelo por cada una de las 12 posiciones posibles.

Las poblaciones que contaron con un mayor número de alelos fueron Jaca Navarra y Caballo de Pura Raza Gallega, con 101, y la que menos Pura Sangre Inglés, con 69. Lo mismo ocurre al promediar el número de alelos por el número de microsatélites.

En la Figura 5.7. se muestra una representación gráfica del número total y medio de alelos encontrado por población y por microsatélite.



**Figura 5.7.:** a) Número observado de alelos por raza para la totalidad de los microsatélites estudiados (valores mínimo y máximo) y número medio de alelos observados por raza, b) Número observado de alelos por microsatélite para todas las razas estudiados (valores mínimo y máximo) y número medio de alelos observados por microsatélite.

Cuando se redujo el tamaño de la muestra, Jaca Navarra, Caballo de Pura Raza Gallega y Pottoka, fueron las razas que mostraron un mayor número medio de alelos. No se encontró una correlación significativa entre el tamaño muestral y el número de alelos detectados.

En algunos de los microsatélites estudiados, aparecieron alelos exclusivos de raza, es decir que solo se encontraban presentes en animales de esa raza, especificándose en la Tabla 5.2..

**Tabla 5.2.:** Alelos exclusivos de raza.

Locus	AST	JN	LOS	CG	PT	MEN	MAL	PSI
HTG4	•	•	•	141	•	•	•	•
HTG6	•	•	•	•	•	•	•	•
HTG7	•	120	•	128	•	•	•	•
HTG8	•	•	•	•	•	•	•	•
HTG10	•	•	•	•	•	•	•	•
HMS2	•	236	•	•	•	•	230	216
HMS3	•	172	•	152	•	•	•	•
HMS6	•	•	•	•	•	173	•	•
HMS7	•	•	•	170	•	•	•	•
ASB2	•	•	•	•	•	•	•	•
AHT4	•	•	•	•	•	•	•	•
AHT5	•	130	•	128	•	•	•	•
VHL20	•	•	•	•	•	•	•	•

Jaca Navarra y Caballo de Pura Raza Gallega fueron las poblaciones que presentaron un mayor número de alelos exclusivos, frente a Asturcón, Losina y Pottoka que no mostraron ninguno.

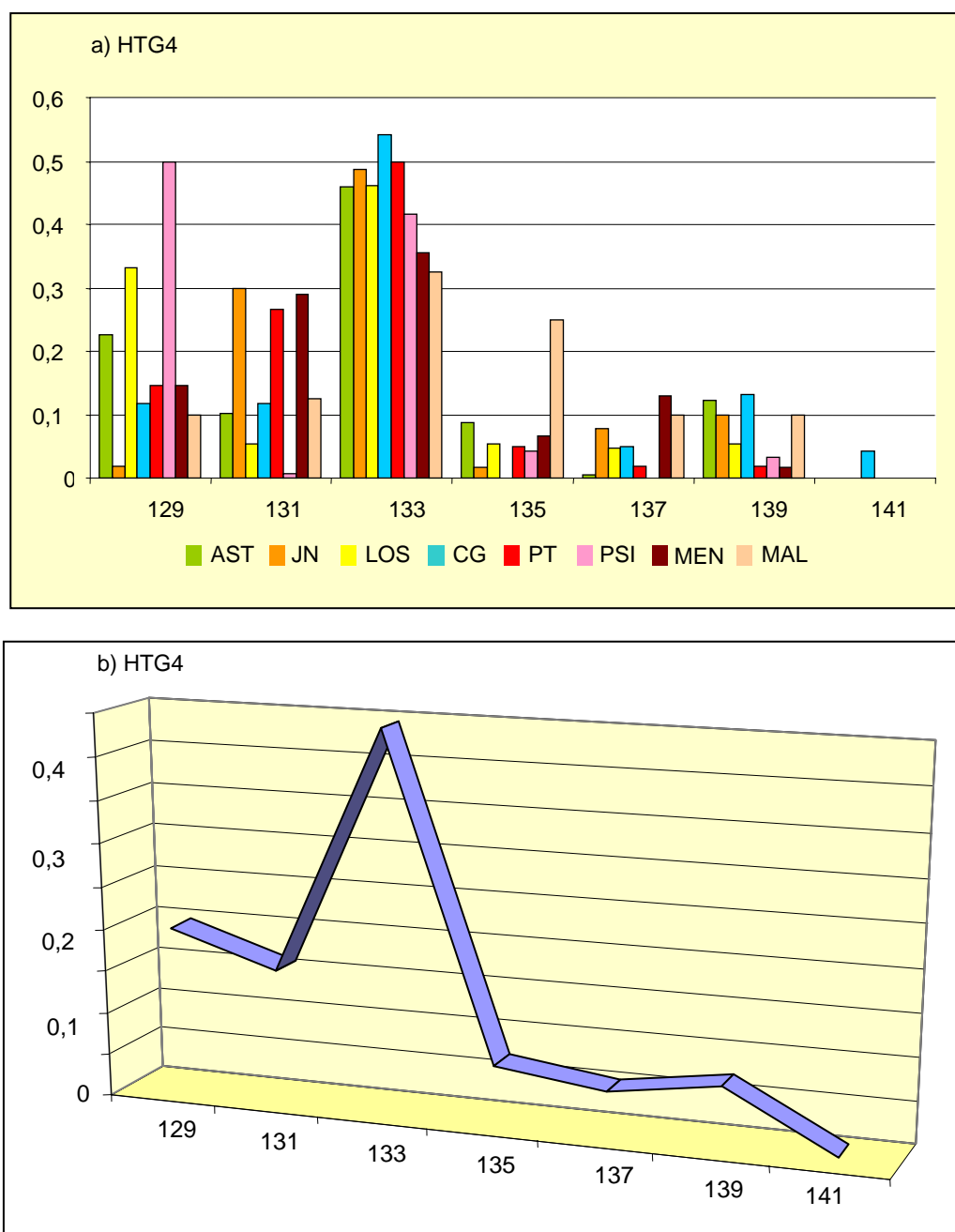
#### V.2.1. Cálculo de las frecuencias alélicas.

Para ilustrar más gráficamente el espectro y distribución de las frecuencias alélicas entre las razas, se han construido 13 histogramas, correspondiente cada uno a un locus diferente.

En el histograma a) aparecen representadas las frecuencias alélicas por razas dentro de ese locus, mientras que en el histograma b) aparecen las frecuencias alélicas medias de todas las razas, con el fin de observar el modelo de distribución al que se ajustan.

El microsatélite HTG4 (Figura 5.8.) presenta una distribución unimodal, representada en su frecuencia más alta por el alelo 133, que se encuentra aproximadamente en la mitad de la distribución de los alelos.

Destaca la presencia única del alelo 141 en la raza Caballo de Pura Raza Gallega, situado en el extremo superior de la distribución, y con una frecuencia del 4,2%. La raza Pura Sangre Inglés, presenta 5 alelos, pero tan solo entre el 129 y 133 acumulan el 91,7% de las frecuencias alélicas.

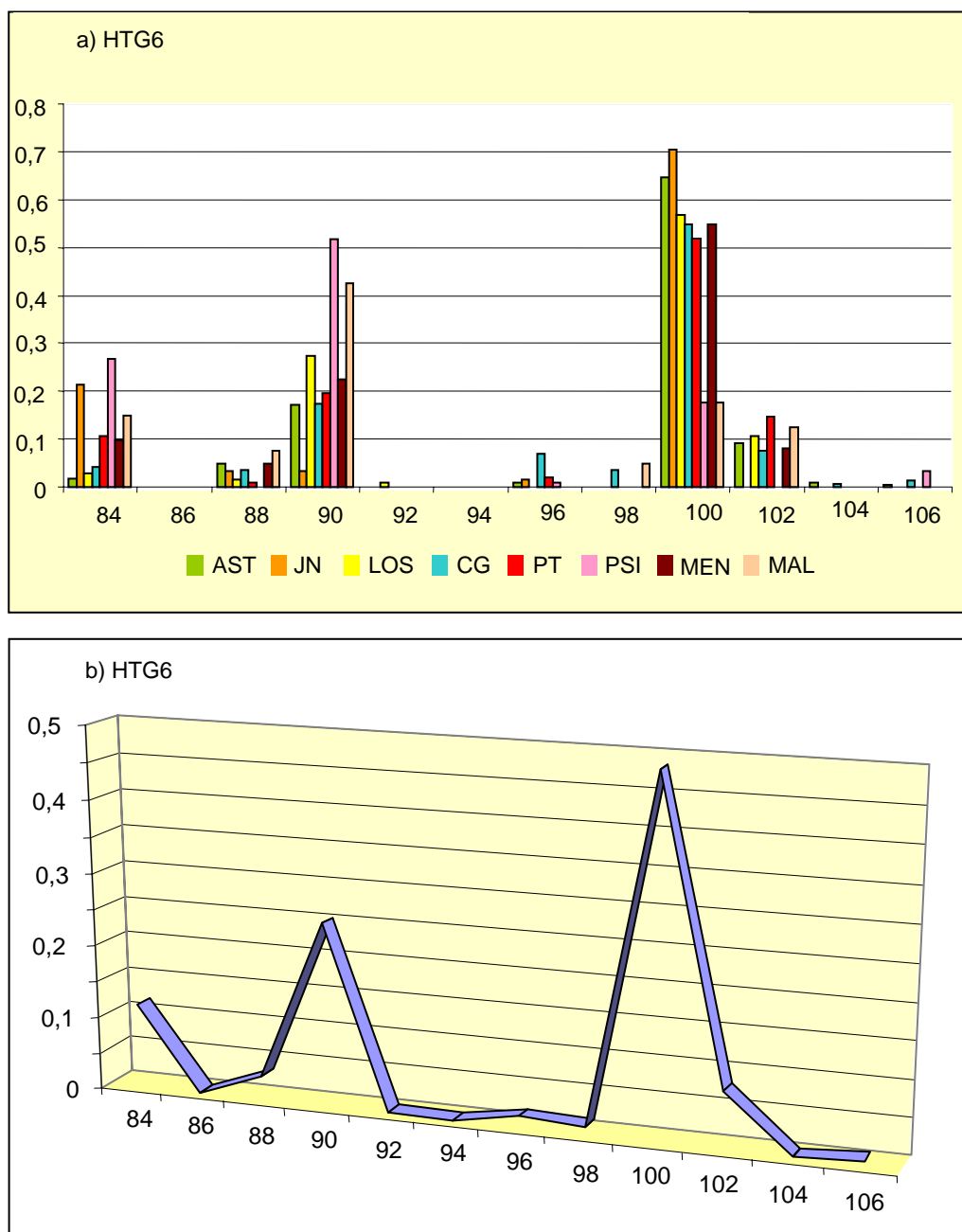


**Figura 5.8.:** Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HTG4 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.



El microsatélite HTG6 (Figura 5.9.) posee una distribución polimodal, en la que destacan los alelos 90 y 100, próximos a los dos márgenes de la distribución.

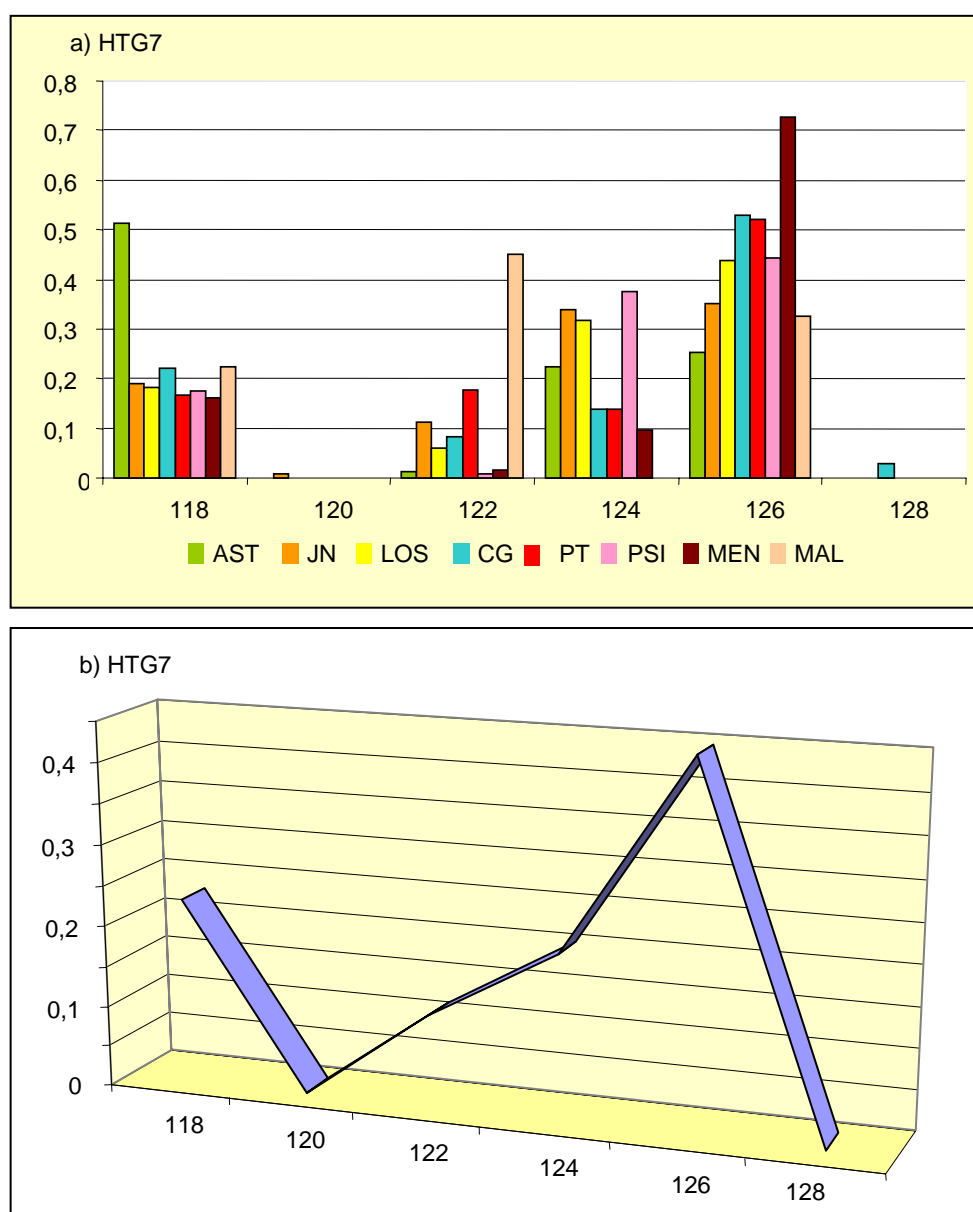
El alelo 92 es exclusivo de la raza Losina, con una frecuencia del 0,8%. El resto de frecuencias alélicas presenta una distribución muy similar entre todas las razas.



**Figura 5.9.:** Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HTG6 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.

El microsatélite HTG7 (Figura 5.10.) también posee una distribución polimodal, con dos modas en los extremos, alelos 118 y 126.

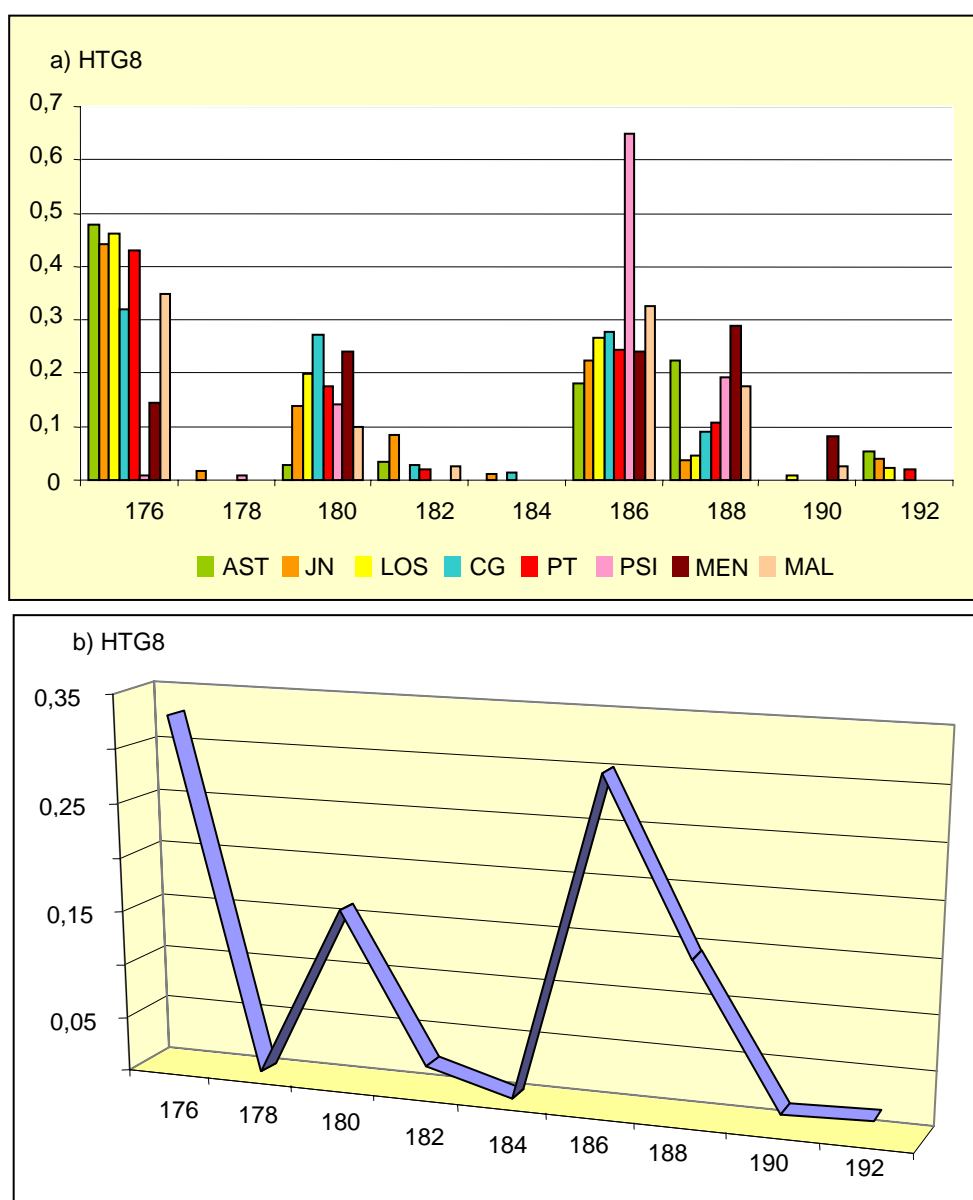
Aparecen dos alelos exclusivos de raza, el 120 (0,8%) en la Jaca Navarra, y el 128 (2,8%) en el Caballo de Pura Raza Gallega. El resto de alelos poseen frecuencias similares en todas las razas, excepto el 122, en la Mallorquina, con un 45%, frente al 6,7% de media en el resto de las razas. Es destacable la presencia del alelo 126 en la raza Menorquina con un 73 % de frecuencia.



**Figura 5.10.:** Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HTG7 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.

El microsatélite HTG8 (Figura 5.11.) posee una distribución polimodal, con tres modas en los alelos 176, 180 y 186.

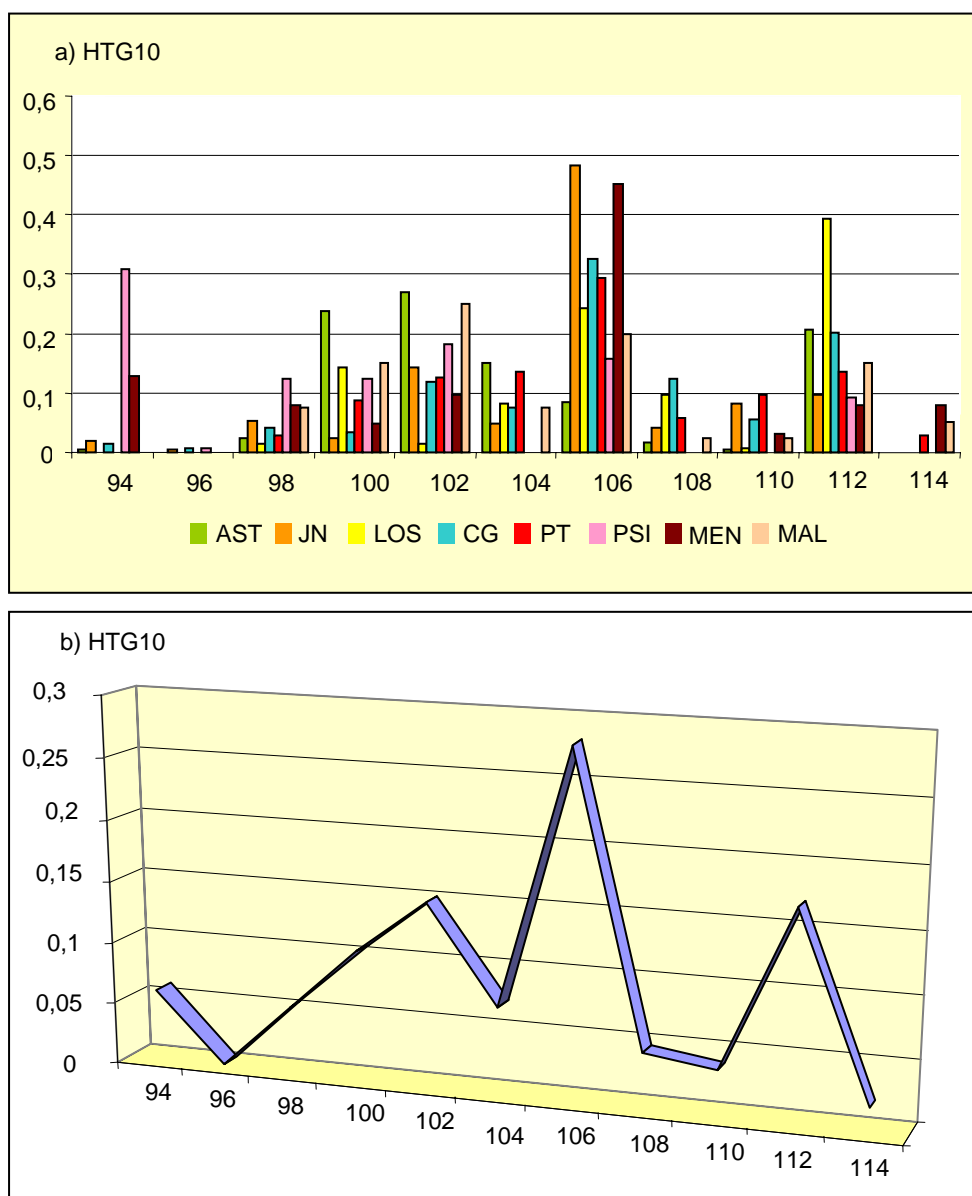
La distribución de las frecuencias alélicas entre las razas es similar, y tan sólo destaca el alelo 186 en Pura Sangre Inglés, con el 65% de las frecuencias y la práctica ausencia del alelo 176 en la raza Mallorquina, que está muy presente en las razas del tronco atlántico.



**Figura 5.11.:** Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HTG8 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.

El microsatélite HTG10 (Figura 5.12.) también posee una distribución polimodal en la que sobresalen los alelos de tamaño medio, 102, 106 y 112.

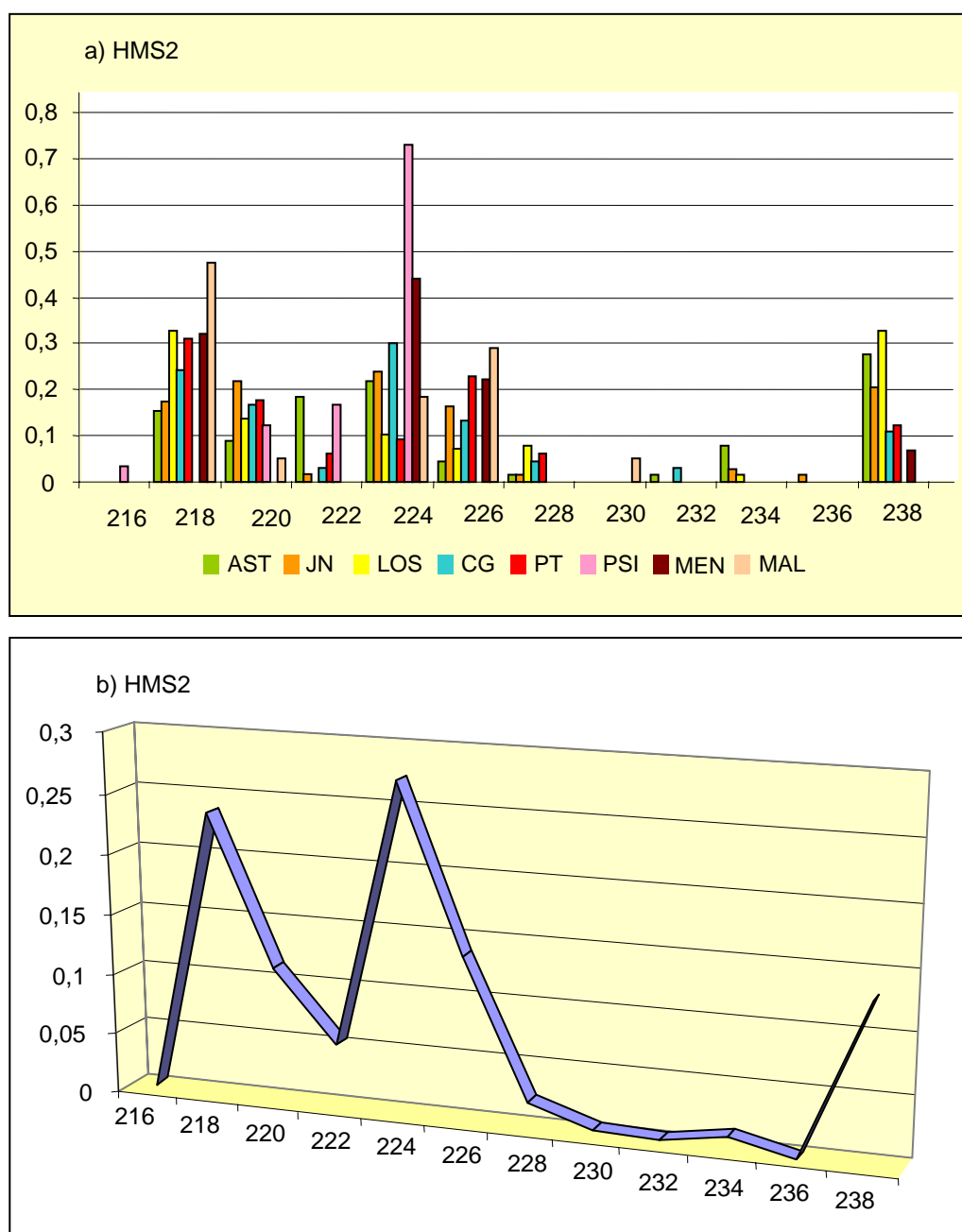
Destacan los valores de 30,8 % y 12,9 % encontrados en las razas Pura Sangre Inglés y Menorquina para el alelo 94, frente al 0,6 % medio encontrado en las razas restantes.



**Figura 5.12.:** Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HTG10 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.

El microsatélite HMS2 (Figura 5.13.) posee una distribución polimodal, con dos modas en los alelos 218 y 224 que se encuentran en la parte inferior del rango alélico.

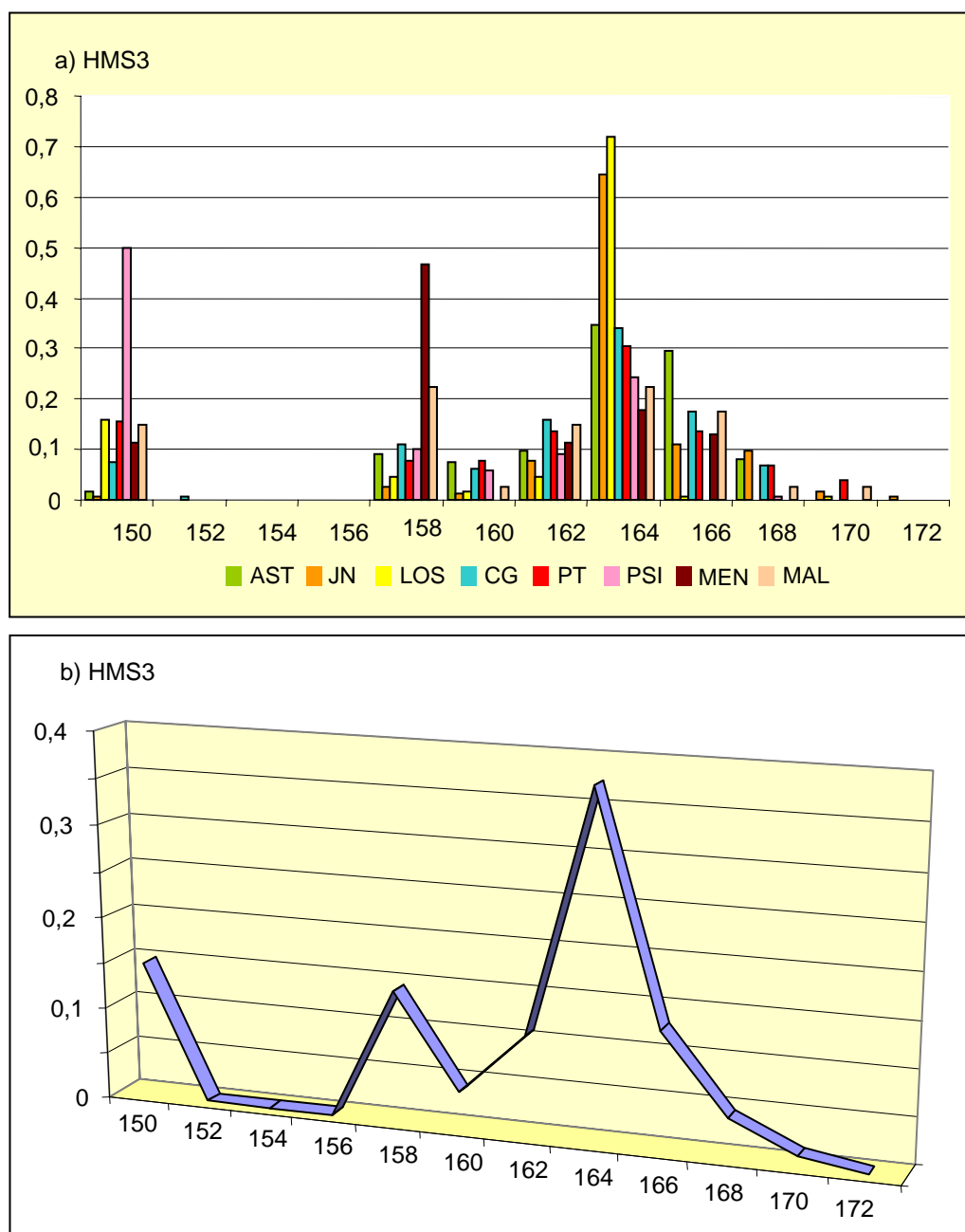
Presenta 3 alelos exclusivos de raza, el 216 en Pura Sangre Inglés (3,3 %), 230 en Mallorquina (5 %) y 236 en Jaca Navarra (0,4 %).



**Figura 5.13.:** Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HMS2 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.

El microsatélite HMS3 (Figura 5.14.) posee una distribución en la que las frecuencias más altas son las de los alelos intermedios (164).

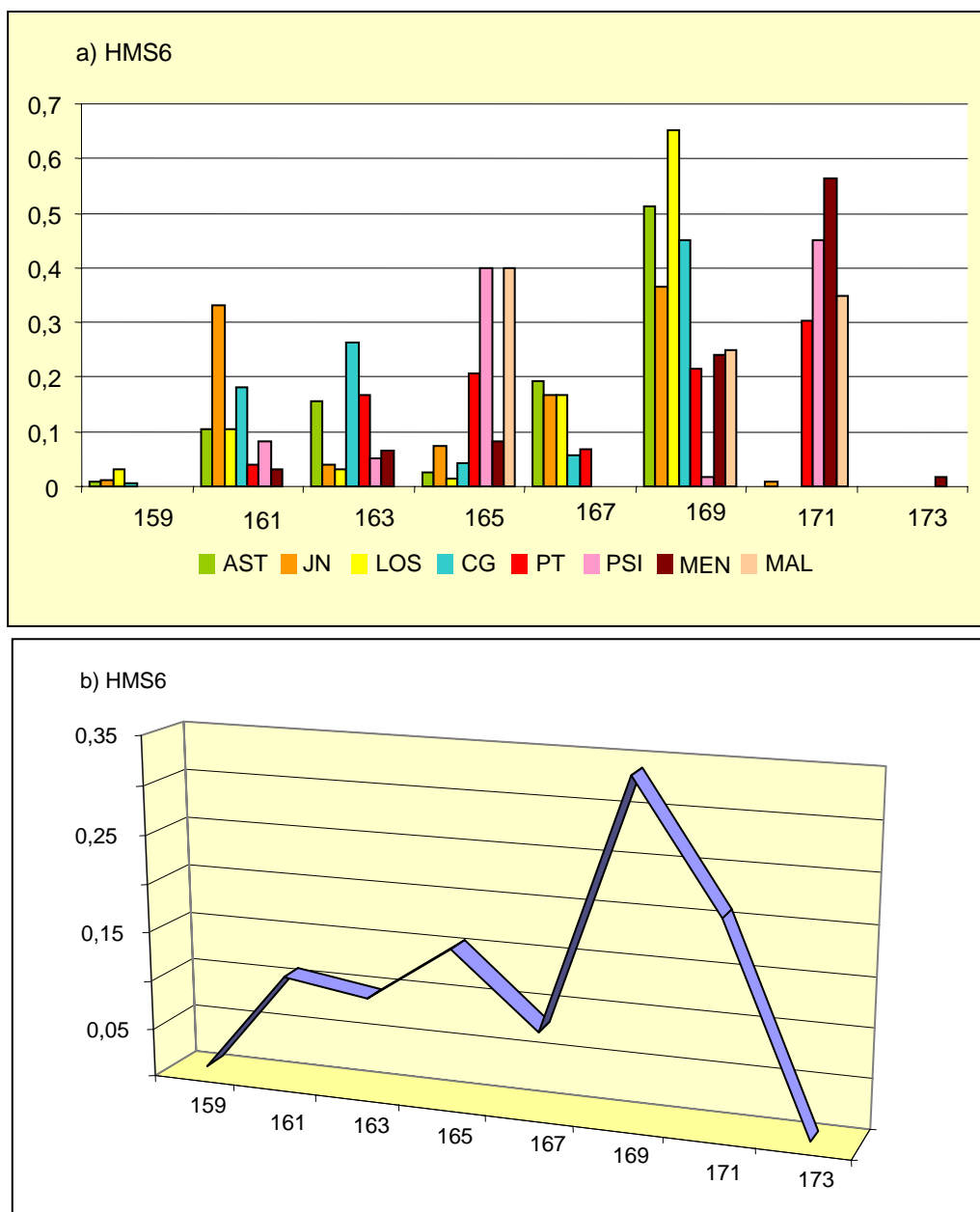
Existen dos alelos exclusivos de raza, el alelo 152 en el Caballo de Pura Raza Gallega (0,7%), y el 172 en la Jaca Navarra (0,8%).



**Figura 5.14.:** Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HMS3 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.

El microsatélite HMS6 (Figura 5.15.) presenta una distribución unimodal, con el alelo 169 a la cabeza.

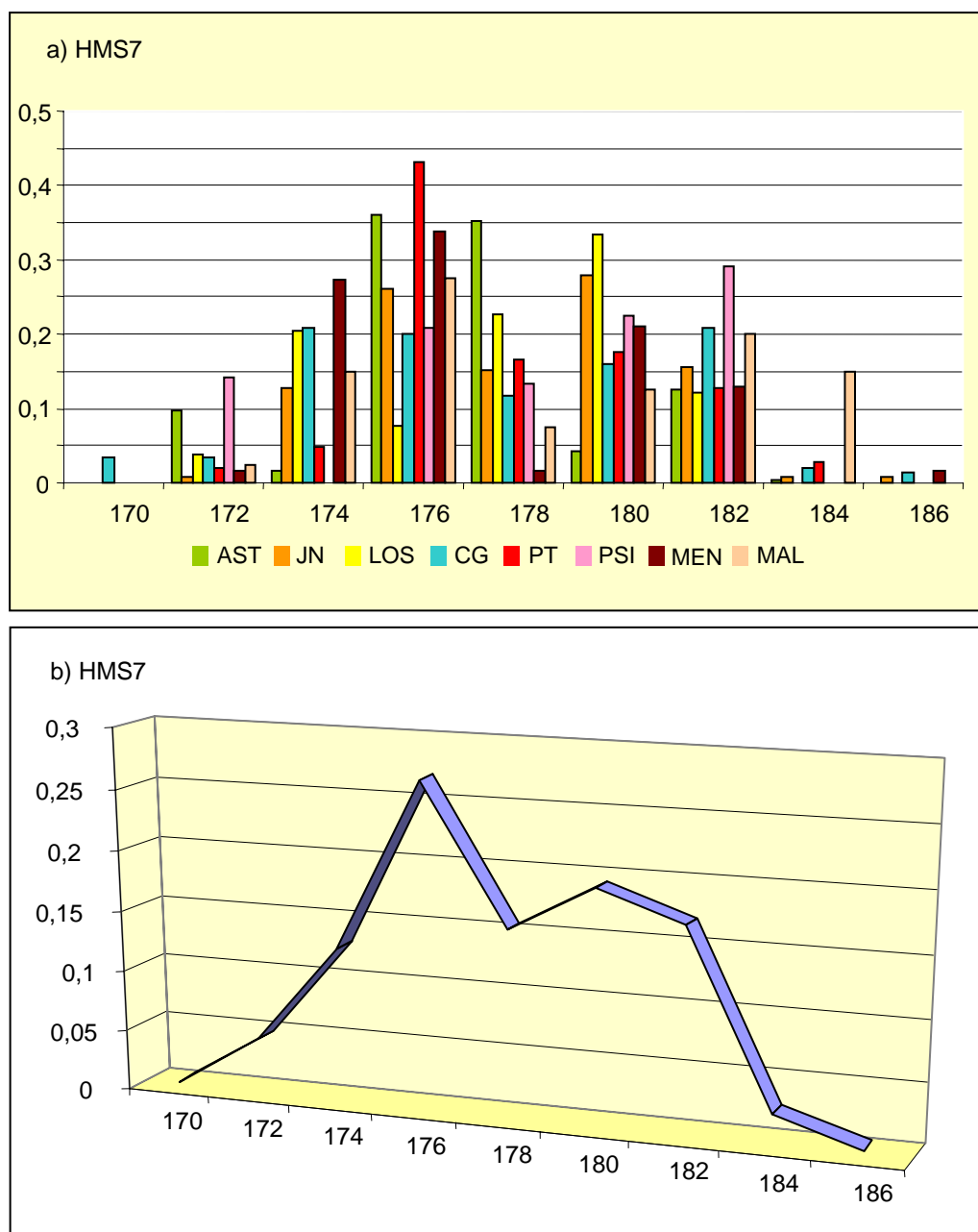
Destaca el alelo 173, exclusivo de la raza Menorquina (1,6%), y la escasa o nula presencia del alelo 171 en las razas Asturcón, Jaca Navarra, Losina y Caballo de Pura Raza Gallega, pero que en Pottoka, Pura Sangre Inglés, Menorquina y Mallorquina posee frecuencias desde 30,4 a 56,5%.



**Figura 5.15.:** Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HMS6 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.

En la distribución del microsatélite HMS7 (Figura 5.16.) destacan dos alelos intermedios, el 176 y el 180.

La raza Caballo de Pura Raza Gallega posee un alelo exclusivo, el 170 con una frecuencia del 3,5%.

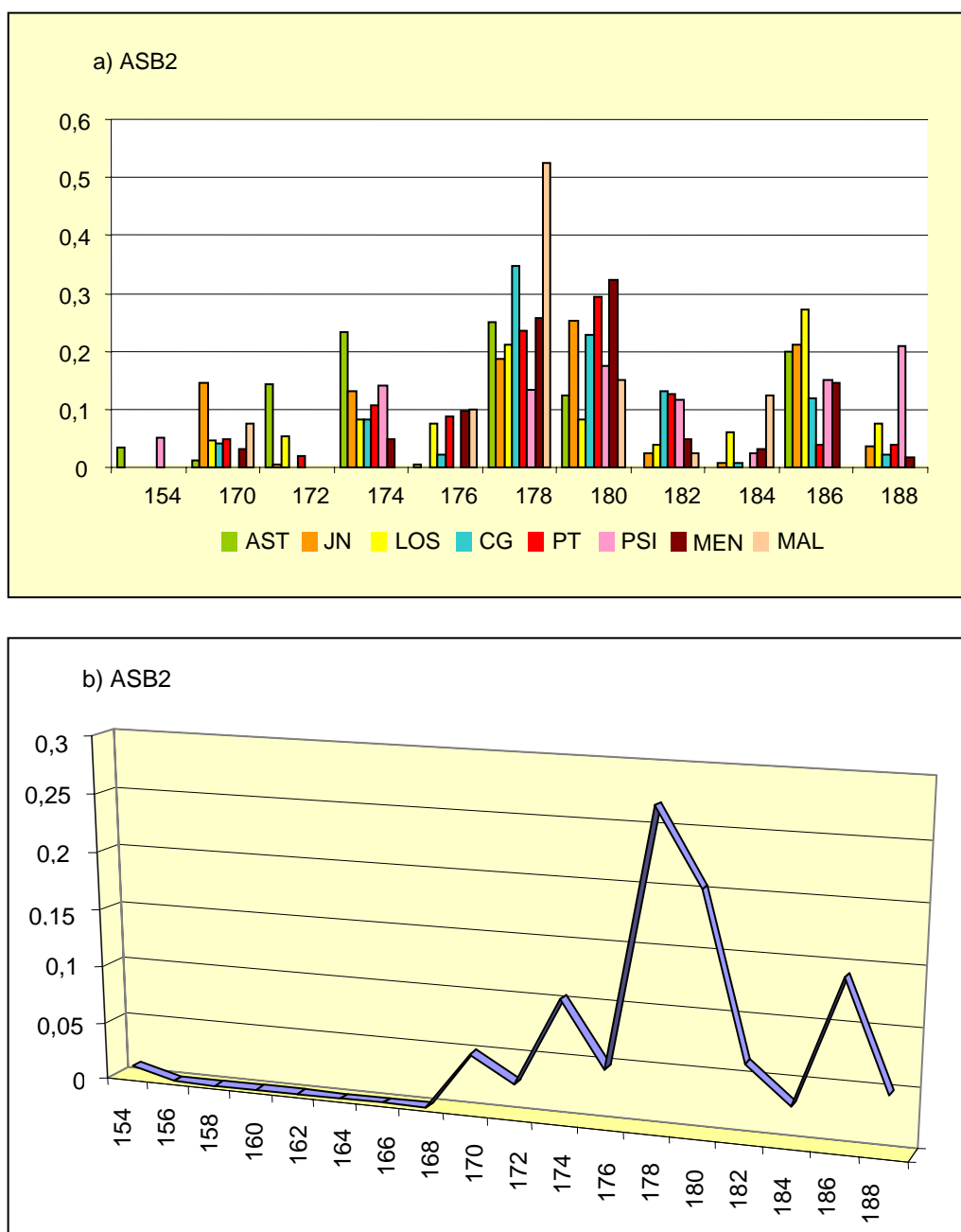


**Figura 5.16.:** Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite HMS7 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.

El microsatélite ASB2 (Figura 5.17.) muestra una distribución unimodal, en la que destacan los alelos de tamaño intermedio, 178 y 180. Hay que destacar también la presencia en las razas Asturcón y Pura Sangre Inglés, de una alelo, el 154, alejado 16 pb (ocho repeticiones) del alelo más próximo, el 170.



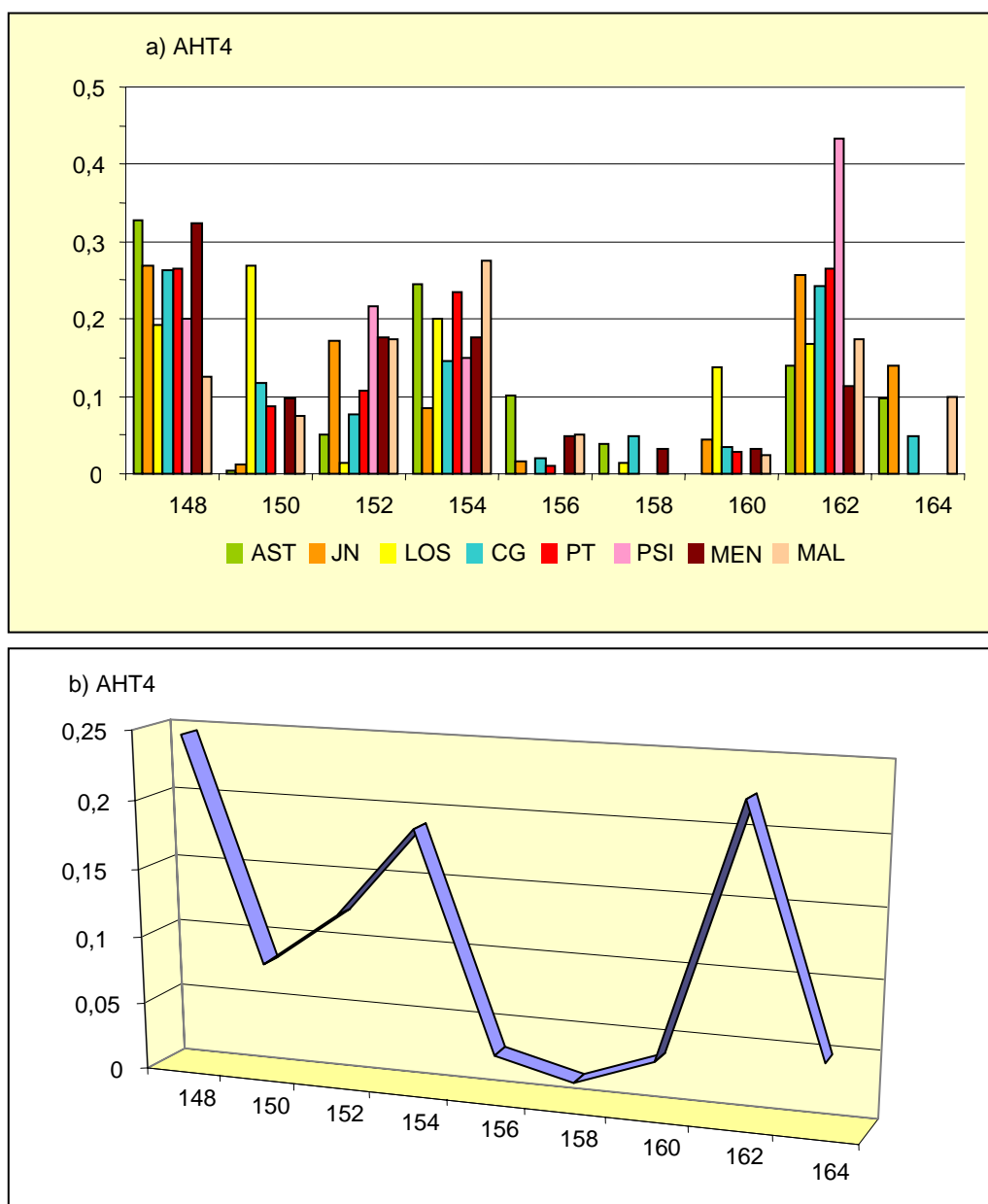
En general la distribución de las frecuencias alélicas entre las razas es muy similar.



**Figura 5.17.:** Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite ASB2 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.

El microsatélite AHT4 (Figura 5.18.) posee una distribución polimodal, con las modas en los alelos extremos y medio (148, 154 y 162).

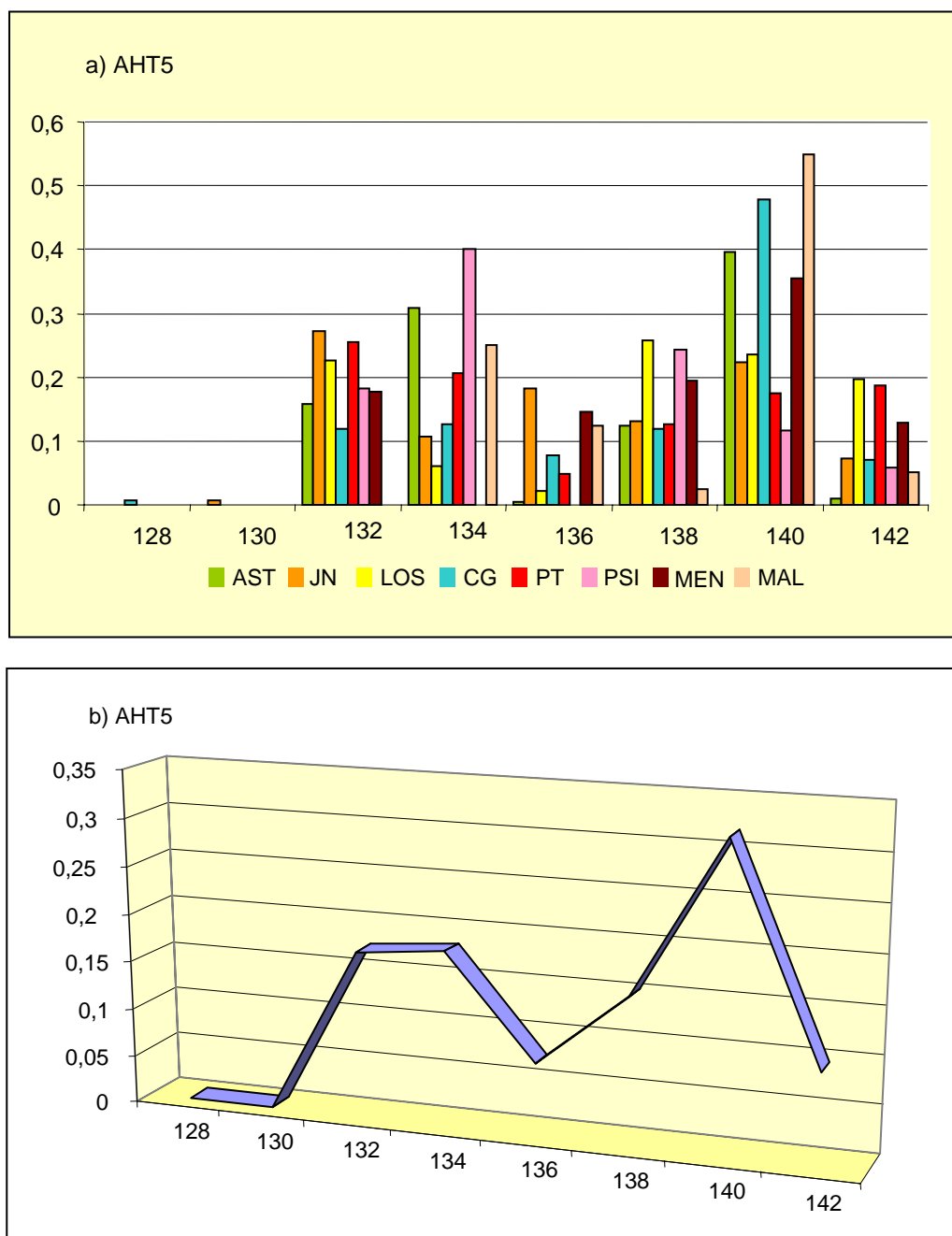
La distribución de las frecuencias alélicas es muy parecida entre todas las razas, sin que exista ningún alelo exclusivo de raza.



**Figura 5.18.:** Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite AHT4 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.

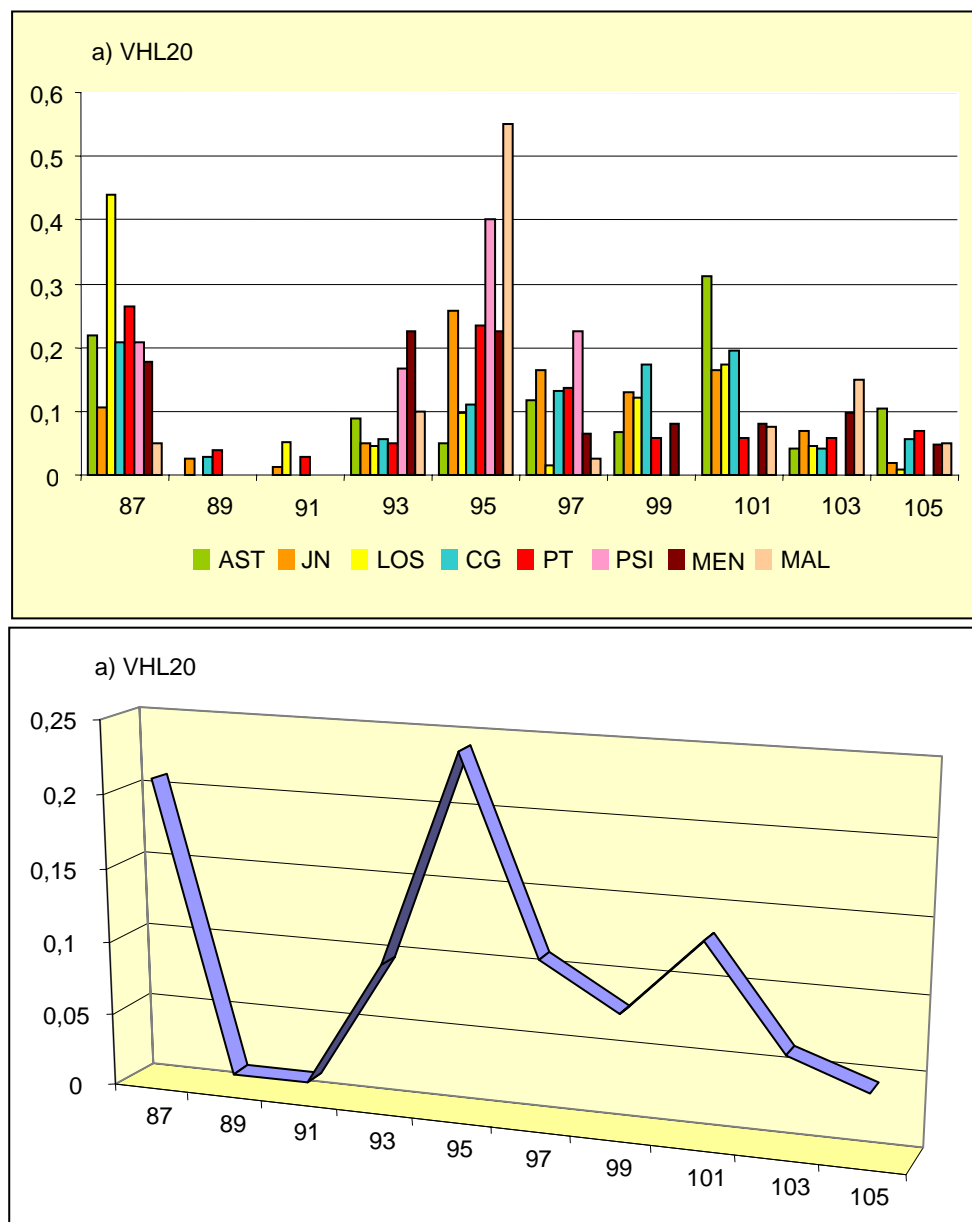
El microsatélite AHT5 (Figura 5.19.) posee una distribución unimodal, donde destaca el alelo 140 situado en el extremo superior de la distribución.

Hay dos alelos exclusivos de raza, el alelo 128, en la población de Caballo de Pura Raza Gallega, con un 0,7% de la frecuencia alélica, y el alelo 130 en la Jaca Navarra con un 0,8% de frecuencia alélica.



**Figura 5.19.:** Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite AHT5 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.

El microsatélite VHL20 (Figura 5.20.) posee una distribución polimodal, con las modas en los alelos 87 y 95. En general la distribución de las frecuencias alélicas fue parecida entre todas las razas.



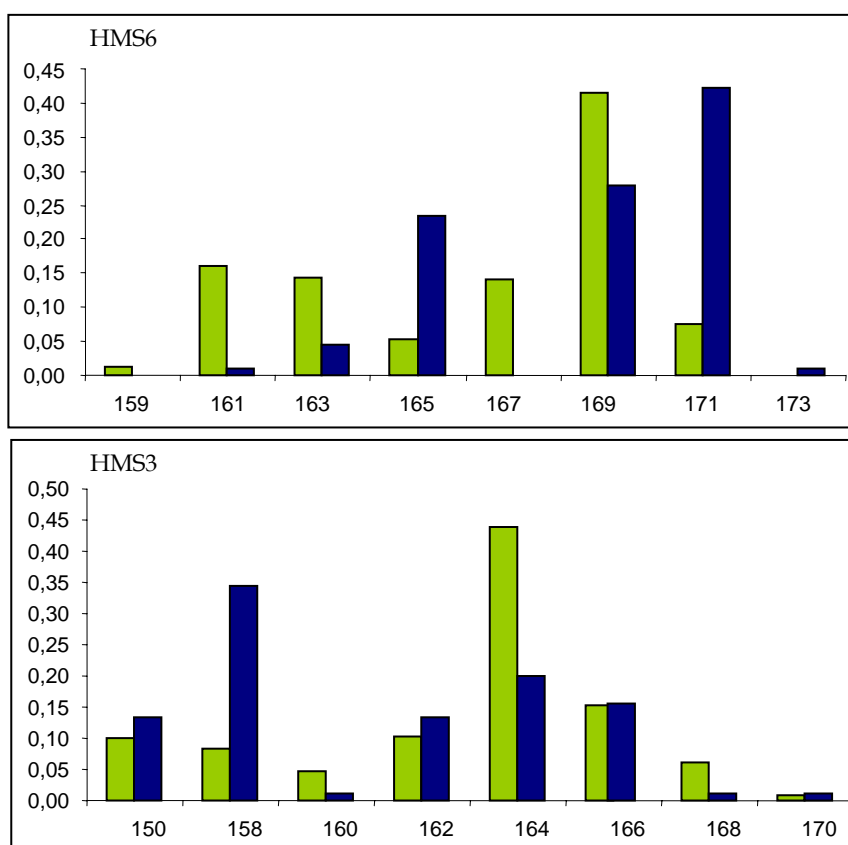
**Figura 5.20.:** Histograma con las frecuencias alélicas del microsatélite VHL20 por raza y diagrama con la distribución de las frecuencias alélicas de todas las razas.

Los valores numéricos de las frecuencias alélicas de cada microsatélite por cada una de las razas estudiadas aparecen en los Anexos 1 a 13.

Al analizar las muestras con menor número de animales representativos de las razas del tronco atlántico y la raza Menorquina, desaparecieron algunos alelos

exclusivos de esas razas que estaban presentes a frecuencias muy bajas en las muestras originales. El número total de alelos exclusivos de los dos troncos fue de 25; 22 alelos para el tronco atlántico y 3 para el mediterráneo. De estos 25 alelos, 13 presentaron una frecuencia mayor del 1%, destacando entre todos ellos el alelo 167 del microsatélite HMS6 con una representación del 14% en el tronco atlántico. Otros alelos importantes, aunque menos representados fueron: alelo 198 del microsatélite HTG8 y 222 de HMS2 con un 4,4% cada uno, y alelo 172 del microsatélite ASB2 con un 3,6%; todos ellos pertenecientes al tronco atlántico.

En relación con la distribución de las frecuencias alélicas (Figura 5.21.), las mayores diferencias se registraron en el microsatélite HMS6, y especialmente en el alelo 171, representado con un 7,6% en las razas del tronco atlántico (barras verdes) y un 42,2% en las razas mediterráneas (barras azules). También es importante la diferencia encontrada en el alelo 158 del microsatélite HMS3, con un 8,4% para el tronco atlántico y un 34,4 % para el mediterráneo.



**Figura 5.21.:** Frecuencias alélicas para el microsatélite HMS3 y HMS6 en el tronco atlántico (verde) y mediterráneo (azul).

### V.2.2. Heterocigosis.

En la Tabla 5.3. se muestran los resultados de *Heterocigosis observada* ( $H_o$ ) y *esperada* ( $H_e$ ) obtenidos con el programa BIOSYS, calculados por locus y por raza, así como los valores finales correspondientes a la totalidad de las poblaciones analizadas.

Analizando los valores individuales de  $H_o$  por locus y por raza, el rango varía entre el valor más bajo, 0,34, encontrado en el locus HMS3 de la raza Jaca Navarra, y el valor más alto, 0,97, del locus AHT5 en la raza Menorquina.

Los valores de  $H_e$  por locus y raza, poseen un rango de variación más estrecho, 0,45 en HTG7 de Menorquina, y 0,86 en el locus HTG10 de la raza Mallorquina.

La mayor diferencia encontrada entre ambos parámetros, fue para el locus HMS3 de Jaca Navarra (0,34/0,56).

Los valores medio de  $H_o$  por locus, muestran que HMS3 y HTG6 son los microsatélites con el valor más bajo (0,61), y AHT4 y VHL20 los marcadores con los valores más altos (0,82).

En cuanto a la  $H_e$ , HTG6 (0,62) mostró el valor más bajo y ASB2 (0,81) el valor más alto. La diferencia mayor entre  $H_o$  y  $H_e$ , se halló en el microsatélite HMS3 (0,61/0,71).

Analizando los valores de heterocigosis por razas, la  $H_o$  más baja se encontró en la raza Pura Sangre Inglés (0,69), y la más alta en la Menorquina (0,75).

La  $H_e$  más baja fue también para la raza Pura Sangre Inglés (0,68), y la más alta para la raza Pottoka (0,77).

La diferencia más grande entre ambos valores,  $H_o$  y  $H_e$ ; se obtuvo en las razas Caballo de Pura Raza Gallega y Mallorquina, con una diferencia del 5%.

**Tabla 5.3.:** Heterocigosis observadas (*Ho*) y esperadas (*He*) para cada raza por microsatélite. Heterocigosis totales con su desviación estándar (d.e.) por microsatélite y por raza. En rojo aparecen marcados los valores más altos de cada una de las heterocigosis por microsatélite y por raza, y en azul los valores más bajos. Recuadrados aparecen los valores de *Ho* y *He* donde las diferencias son mayores.

		AST	JN	LOS	CG	PT	MEN	MAL	PSI	TOTAL (d.e.)
HTG4	<i>Ho</i>	0,75	0,62	0,68	0,69	0,67	0,84	0,70	0,63	<b>0,70</b> (0,07)
	<i>He</i>	0,71	0,66	0,67	0,66	0,66	0,76	0,81	0,58	<b>0,69</b> (0,07)
HTG6	<i>Ho</i>	0,49	0,40	0,68	0,67	0,63	0,65	0,70	0,68	<b>0,61</b> (0,10)
	<i>He</i>	0,54	0,46	0,60	0,66	0,66	0,64	0,76	0,64	<b>0,62</b> (0,08)
HTG7	<i>Ho</i>	0,61	0,71	0,79	0,64	0,69	0,48	0,55	0,63	<b>0,64</b> (0,09)
	<i>He</i>	0,63	0,72	0,67	0,65	0,66	<b>0,45</b>	0,66	0,64	<b>0,64</b> (0,07)
HTG8	<i>Ho</i>	0,72	0,71	0,67	0,64	0,73	0,77	0,60	0,50	<b>0,67</b> (0,08)
	<i>He</i>	0,69	0,73	0,68	0,74	0,72	0,78	0,75	0,53	<b>0,70</b> (0,07)
HTG10	<i>Ho</i>	0,84	0,73	0,61	0,81	0,71	0,71	0,75	0,82	<b>0,75</b> (0,07)
	<i>He</i>	0,80	0,72	0,75	0,82	0,85	0,76	<b>0,86</b>	0,81	<b>0,80</b> (0,05)
HMS2	<i>Ho</i>	0,80	0,81	0,71	0,76	0,75	0,74	0,75	0,43	<b>0,72</b> (0,117)
	<i>He</i>	0,83	0,82	0,78	0,82	0,82	0,69	0,70	0,49	<b>0,74</b> (0,11)
HMS3	<i>Ho</i>	0,76	<b>0,34</b>	0,41	0,67	<b>0,67</b>	0,68	0,75	0,60	<b>0,61</b> (0,14)
	<i>He</i>	0,77	<b>0,56</b>	0,46	0,81	<b>0,84</b>	0,72	0,84	0,68	<b>0,71</b> (0,13)
HMS6	<i>Ho</i>	0,62	0,72	0,56	0,68	0,80	0,65	0,60	0,62	<b>0,66</b> (0,07)
	<i>He</i>	0,67	0,72	0,54	0,69	0,79	0,62	0,67	0,63	<b>0,67</b> (0,07)
HMS7	<i>Ho</i>	0,75	0,8	0,82	0,82	0,82	0,74	0,85	0,87	<b>0,81</b> (0,04)
	<i>He</i>	0,72	0,79	0,78	0,84	0,74	0,76	0,84	0,79	<b>0,78</b> (0,04)
AHT4	<i>Ho</i>	0,84	0,90	0,86	0,68	0,69	0,90	0,85	0,80	<b>0,82</b> (0,08)
	<i>He</i>	0,79	0,81	0,81	0,83	0,79	0,82	0,85	0,71	<b>0,80</b> (0,04)
AHT5	<i>Ho</i>	0,72	0,79	0,85	0,61	0,80	<b>0,97</b>	0,75	0,75	<b>0,78</b> (0,10)
	<i>He</i>	0,71	0,81	0,79	0,72	0,82	<b>0,78</b>	0,63	0,74	<b>0,75</b> (0,06)
ASB2	<i>Ho</i>	0,87	0,79	0,83	0,76	0,80	0,74	0,55	0,88	<b>0,78</b> (0,10)
	<i>He</i>	0,81	0,82	0,85	0,79	0,83	0,81	0,69	<b>0,86</b>	<b>0,81</b> (0,05)
VHL20	<i>Ho</i>	0,83	0,81	0,83	0,81	0,88	0,90	0,70	0,80	<b>0,82</b> (0,06)
	<i>He</i>	0,82	0,85	0,75	<b>0,86</b>	0,84	0,85	0,67	0,72	<b>0,80</b> (0,07)
TOTAL (d.e.)	<i>Ho</i>	<b>0,74</b> (0,11)	<b>0,70</b> (0,16)	<b>0,72</b> (0,13)	<b>0,71</b> (0,07)	<b>0,74</b> (0,07)	<b>0,75</b> (0,12)	<b>0,70</b> (0,10)	<b>0,69</b> (0,14)	<b>0,72</b>
	<i>He</i>	<b>0,73</b> (0,08)	<b>0,73</b> (0,11)	<b>0,70</b> (0,11)	<b>0,76</b> (0,07)	<b>0,77</b> (0,07)	<b>0,73</b> (0,11)	<b>0,75</b> (0,08)	<b>0,68</b> (0,11)	<b>0,73</b>

### V.2.3. Equilibrio Hardy-Weinberg.

Los resultados de los dos tipos de análisis efectuados para conocer la desviación de los loci y razas con respecto al equilibrio Hardy-Weinberg, aparecen en la Tabla 5.4..

**Tabla 5.4.:** Desviaciones con respecto al equilibrio Hardy -Weinberg de las razas analizadas, por microsatélite y total, calculadas con los métodos de cadenas de Markov y con un test  $\chi^2$ -cuadrado siguiendo el método de Fisher (\* significativo  $P<0,05$ ; \*\* significativo  $P<0,01$ ).

Markov $\chi^2$	AST	JN	LOS	CG	PT	MEN	MAL	PSI	TOTAL
HTG4		**							
HTG6		*	*						*
HTG7		**							
HTG8									
HTG10			**				*		**
HMS2	*		**				**		
HMS3		**		**	*				**
HMS6							*		
HMS7							*		
ASB2			**			*			*
AHT4			**	**	**				**
AHT5		**							
VHL20	*								
TOTAL		**	**	**					

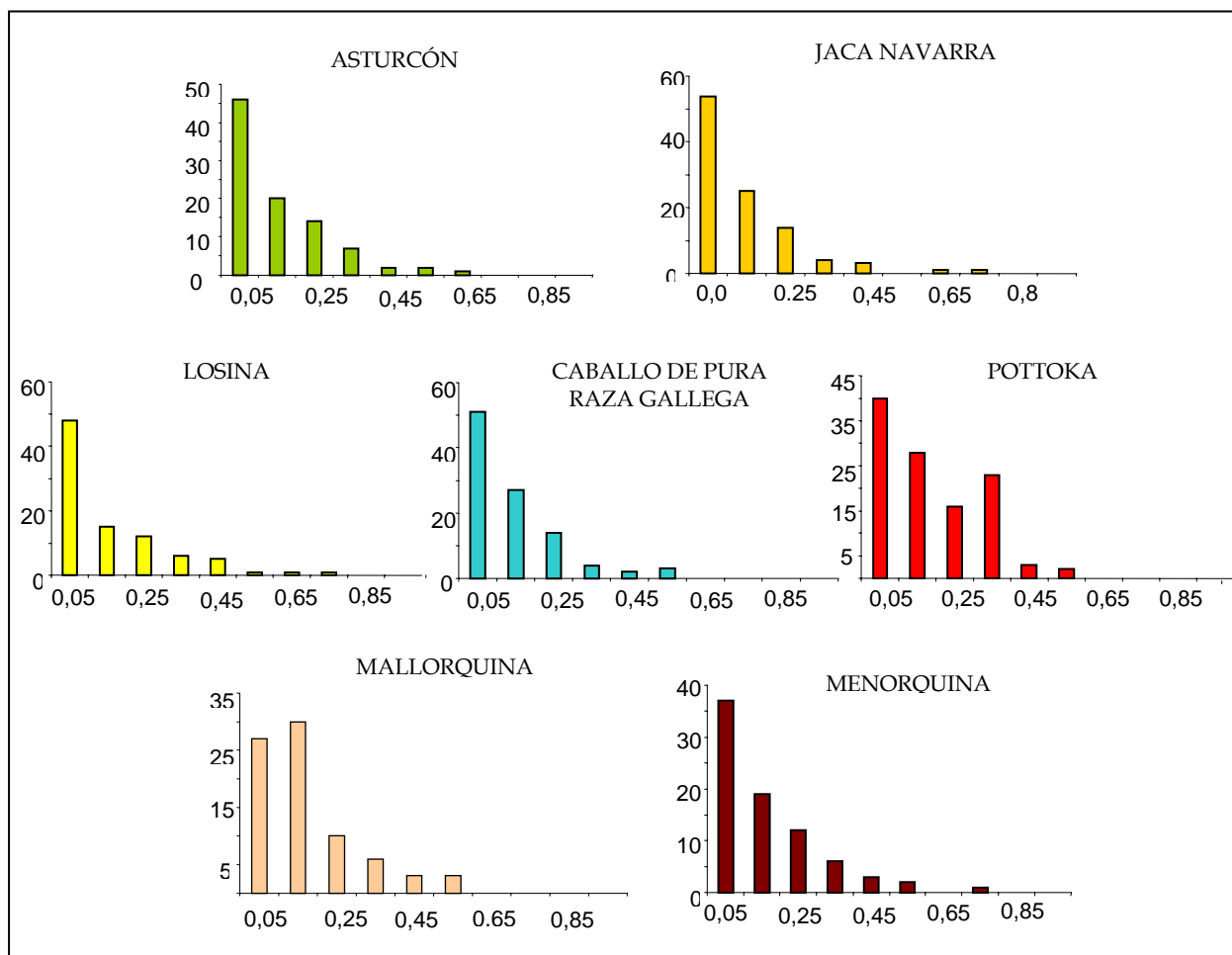
Cuando se estudiaron todos los loci para la población total que agrupaba a todas las razas, tres microsatélites mostraron desviaciones significativas ( $P<0,01$ ), HTG10, HMS3 y AHT4.

El estudio de las razas para el total de los marcadores, mostró que Jaca Navarra, Losina y Caballo de Pura Raza Gallega presentaban desviaciones significativas ( $P<0,01$ ).



### V.3. Estimación de un episodio reciente de cuello de botella.

Los resultados de aplicar el método descrito por Luikart y col. (1998) , para detectar poblaciones que han atravesado recientemente un cuello de botella, se muestra en la Figura 5.22.



**Figura 5.22.:** Distribución de las frecuencias alélicas de todos los microsatélites por categorías (0,00-0,10) (0,11-0,20) (0,21-0,30) (0,31-0,40) (0,41-0,50) (0,51-0,60) (0,61-0,70) (0,71-0,80) (0,81-0,90) (0,91-1,00) para cada raza analizada.

Como se puede observar, tan sólo una de las razas, la Mallorca, presenta lo que los autores denominan “salto-modal”, entre la primera de las categorías (0,001-0,100) y la segunda (0,101-0,200). Esto demuestra que los alelos de muy baja frecuencia son menos abundantes que los alelos con frecuencias intermedias, siendo ésta una de las características de las poblaciones que han atravesado recientemente un cuello de botella.

En cuanto a los resultados del método basado en el exceso de heterocigosis observada, para una nivel de significación  $P < 0,01$ , un número mayor de razas puede considerarse que han atravesado recientemente un cuello de botella, concretamente, las razas Asturcón, Pottoka y Mallorquina. Si consideramos un nivel de significación  $P < 0,05$ , absolutamente todas las razas habrían atravesado recientemente un cuello de botella.

#### V.4. Estimación de la diferenciación genética entre poblaciones.

##### V.4.1. Test de diferenciación génica por pares de poblaciones y sobre el total de las razas.

El análisis de diferenciación génica por pares de poblaciones, así como sobre el total de las mismas, ha sido significativo cuando se considera la totalidad de los loci analizados.

Teniendo en cuenta el análisis por locus, las diferencias por pares de poblaciones también han sido significativas ( $P < 0,01$ ) en la mayoría de los análisis, excepto en las situaciones que se describen en la Tabla 5.5..

**Tabla 5.5.:** Pares de poblaciones que no muestran ser significativamente diferentes ( $P < 0,01$ ) en el test de diferenciación génica de Fisher.

---

<b>HTG4:</b> (PT x MEN) – (MEN x MAL)
<b>HTG6:</b> (AST x LOS) – (AST x MEN) – (LOS x MEN) – (CG x MEN) – (PT x MEN)
<b>HTG7:</b> (JN x LOS) – (LOS x PSI) – (CG x PT) – (CG x MEN)
<b>HTG8:</b> (AST x MAL) – (JN x PT) – (JN x MAL) – (LOS x PT) – (LOS x MAL) – (CG x PT) – (CG x MAL) – (PT x MAL) – (MEN x MAL)
<b>HTG10:</b> (PT x MAL)
<b>HMS3:</b> (CG x PT) – (CG x MAL) – (PT x MAL) – (MEN x MAL)
<b>HMS7:</b> (CG x MEN) – (CG x MAL) – (PT x MAL) – (MEN x MAL)
<b>ASB2:</b> (CG x PT) – (PT x MEN) – (CG x MEN)
<b>AHT4:</b> (CG x PT) – (CG x MEN) – (PT x MEN) – (PT x MAL) – (MEN x MAL)
<b>AHT5:</b> (CG x MAL)
<b>VHL20:</b> (PT x MEN) – (MEN x MAL)

---

Los microsatélites HMS2 y HMS6 son los únicos marcadores que han mostrado niveles significativos de diferenciación para todos los pares de poblaciones, y el microsatélite HTG8 ha sido el marcador que menos parejas de poblaciones se ha diferenciado.

Desde el punto de vista de las razas, Pottoka, Caballo de Pura Raza Gallega, Menorquina y Mallorquina han sido las razas que menos diferencias significativas han mostrado en el análisis por locus.

#### V.4.2. Cálculo de los estadísticos F de Wright y del coeficiente de diferenciación génica ( $G_{ST}$ ).

En la Tabla 5.6., están descritos los valores de  $F_{IS}$  encontrados en cada raza.

**Tabla 5.6.:** Valores de  $F_{IS}$  estimados por raza.

	AST	JN	LOS	CG	PT	MEN	MAL	PSI
$F_{IS}$	-0,012	0,034	-0,019	0,066	0,039	-0,036	0,066	-0,025

De la Tabla 5.6., se deduce que las razas Asturcón, Losina, Menorquina y Pura Sangre Inglés presentan un valor negativo para su  $F_{IS}$ , lo que significa que poseen un exceso de heterocigotos. El resto de poblaciones poseen un defecto de heterocigotos como consecuencia del cruzamiento no aleatorio, y de todas ellas, las que lo presentan de forma más destacada son Caballo de Pura Raza Gallega y Mallorquina (0,066).

Los valores por locus de los estadísticos F y sus significaciones aparecen en la Tabla 5.7.

Si cuantificamos el efecto total de la pérdida de heterocigotos, obtenemos un valor final de  $F_{IS}$  de 0,014, que es significativo para un nivel  $P < 0,05$ , lo que significa que existe una pérdida del 1,4% de heterocigotos con respecto a una situación ideal de panmixia.

De todos los microsatélites estudiados, tan sólo HMS3 es significativo para  $P < 0,01$ , siendo éste el principal responsable de esta situación.

Los valores de  $F_{ST}$  obtenidos fueron significativos para todos los loci para un nivel de significación de  $P < 0,01$ . El valor total obtenido fue de 0,078; esto significa que tan sólo el 7,8% de la variabilidad observada es consecuencia de diferencias entre razas, siendo el 92,2% restante debido a diferencias entre individuos.

El microsatélite HMS6 fue el locus que explicó más porcentaje de variabilidad debido a diferencias entre razas, 15,3%, mientras que el AHT5 fue el marcador que detectó menos variabilidad, 4,1%.

**Tabla 5.7.:** Valores de  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$ ,  $G_{ST}$  y  $F_{IT}$  calculados por microsatélite y su valor total. En rojo aparecen los valores más altos y en azul los más bajos. (\*  $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ )

	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$G_{ST}$	$F_{IT}$
HTG4	-0,015	0,060**	0,062	0,046*
HTG6	0,025	0,108**	0,099	0,130**
HTG7	-0,07	0,082**	0,094	0,076**
HTG8	0,024	0,079**	0,077	0,101**
HTG10	0,033	0,081**	0,065	0,111**
HMS2	0,041	0,080**	0,099	0,118**
HMS3	0,158**	0,112**	0,109	0,253**
HMS6	0,019	0,153**	0,163	0,169**
HMS7	-0,036	0,056**	0,057	0,022
ASB2	-0,015	0,058**	0,070	0,043**
AHT4	0,005	0,042**	0,053	0,046**
AHT5	-0,033	0,041**	0,041	0,009
VHL20	-0,004	0,061**	0,070	0,057**
TOTAL	0,014*	0,078**	0,081**	0,090**

Comparando aisladamente las razas del tronco atlántico, el valor de  $F_{ST}$  fue 0,051, significativo para  $P < 0,01$ ; y entre las razas mediterráneas el valor  $F_{ST}$  fue de 0,065, también significativo ( $P < 0,01$ ). El valor de  $F_{ST}$  estimado entre el tronco atlántico y el balear fue significativo (0,081;  $P < 0,01$ ).

Los valores de  $G_{ST}$  estimados fueron en todos los casos muy similares a los obtenidos para  $F_{ST}$ .

El valor total de  $F_{IT}$  calculado, 0,090, indica que el 9% de pérdida de heterocigotos es consecuencia del cruzamiento no aleatorio y de la fragmentación en subpoblaciones, siendo este valor un compendio de los dos anteriores,  $F_{IS}$  y  $F_{ST}$ .

De todos los marcadores estudiados, HMS3 es el locus que más contribuye a esta pérdida (25,3%) y AHT5 el que menos (0,9%).

## V.5. Análisis filogenético.

### V.5.1. Estima de distancias genéticas entre poblaciones.

Se estimaron dos medidas de distancia genética entre pares de poblaciones.

La primera de ellas fue la distancia  $D_a$  de Nei (1983), cuya matriz, obtenida por medio del programa DISPAN, aparece en la Tabla 5.8..

**Tabla 5.8.:** Matriz con las distancias genéticas  $D_a$  estimadas por pares de poblaciones. En rojo aparecen los valores más altos y en azul los más bajos.

	AST	JN	LOS	CG	PT	PSI	MEN	MAL
AST	0,00							
JN	0,116	0,00						
LOS	0,131	0,113	0,00					
CG	0,096	0,067	0,090	0,00				
PT	0,118	0,086	0,102	0,069	0,00			
PSI	0,256	0,250	0,267	0,232	0,191	0,00		
MEN	0,203	0,150	0,163	0,121	0,104	0,207	0,00	
MAL	0,219	0,200	0,224	0,161	0,120	0,262	0,134	0,00

Los valores más altos, que indican una mayor distancia genética entre un par de razas, fueron los obtenidos entre la raza Pura Sangre Inglés y la mayoría del resto de las razas, variando entre 0,19 a 0,27.

La distancia genética más baja fue la encontrada entre las poblaciones Caballo de Pura Raza Gallega con Jaca Navarra y Pottoka (0,07).

La otra medida de distancia genética calculada fue el índice  $F_{ST}$ , cuyos valores de distancia entre pares de poblaciones aparecen en la matriz media inferior (Tabla

5.9.), y en la superior, el número estimado de migrantes por generación que sería necesario que hubiera entre dos razas para que se modificara el valor de la distancia genética.

**Tabla 5.9.:** Matriz con los valores  $F_{ST}$  calculados por pares de poblaciones. En rojo aparecen los valores más altos y en azul los más bajos.

	AST	JN	LOS	CG	PT	PSI	MEN	MAL
AST		3,66	3,51	5,49	4,20	1,42	2,17	2,25
JN	0,064		4,17	7,05	5,93	1,49	2,93	2,18
LOS	0,067	0,057		5,36	3,94	1,35	2,17	1,83
CG	0,044	0,034	0,045		9,52	1,81	5,05	3,62
PT	0,056	0,041	0,060	0,026		2,23	6,26	5,07
PSI	0,150	0,144	0,157	0,121	0,100		2,02	1,88
MEN	0,103	0,079	0,103	0,047	0,038	0,110		3,60
MAL	0,100	0,103	0,120	0,065	0,047	0,118	0,065	

Al igual que ocurría con la distancia anterior los valores más altos de  $F_{ST}$  se han producido entre la raza Pura Sangre Inglés y el resto de razas (0,100 a 0,157), y los valores más bajos entre las razas de Caballo de Pura Raza Gallega con Jaca Navarra y Pottoka, 0,034 y 0,026 respectivamente.

Los valores de  $F_{ST}$  y  $Nm$  son inversamente proporcionales, por tanto, el valor más alto de migrantes necesario para modificar el valor de la distancia genética entre Pottoka y Caballo de Pura Raza Gallega fue de 9,52, que es uno de los pares de poblaciones más cercanos. El valor más bajo, 1,35, se dio entre Losina y Pura Sangre Inglés, que son las dos poblaciones genéticamente más distantes.

El valor de  $r$  (Coeficiente de correlación de Pearson) fue de 0,97, lo que da idea de lo altamente correlacionadas que están ambas matrices de distancias,  $F_{ST}$  y  $Da$ .

En la Tabla 5.10. aparecen los valores de  $r$  entre las matrices de distancias  $F_{ST}$  obtenidas por microsatélite.

En este caso, las correlaciones entre las matrices de distancias  $F_{ST}$  obtenidas por microsatélite, muestran que los marcadores menos correlacionados son HTG7, HMS3 y HMS6.

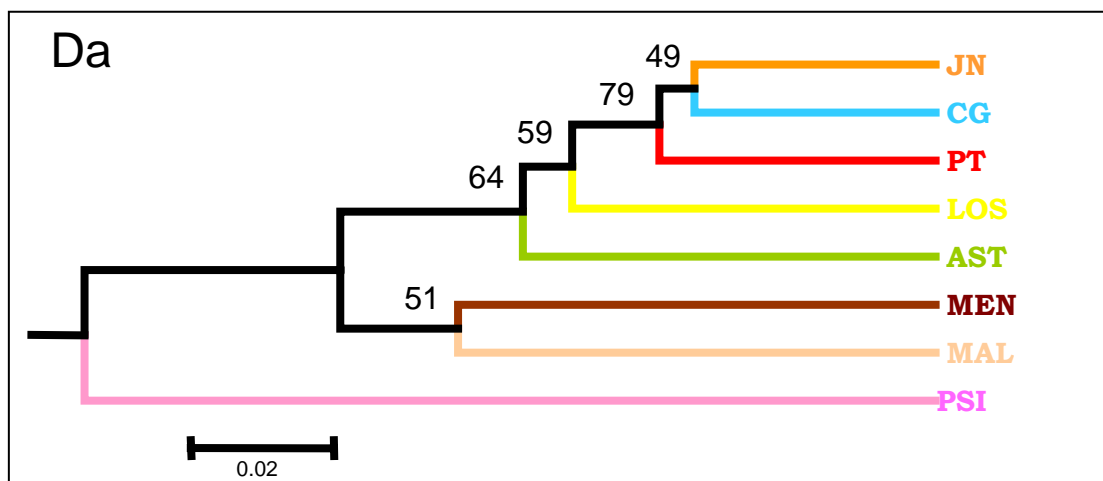
**Tabla 5.10.:** Matriz de correlaciones de Pearson ( $r$ ) entre las matrices de distancias genéticas  $F_{ST}$  obtenidas por microsatélite. En rojo aparece el valor más alto y en azul el más bajo, las celdas sombreadas muestran los valores negativos.

	HTG4	HTG6	HTG7	HTG8	HTG10	HMS2	HMS3	HMS6	HMS7	ASB2	AHT4	AHT5	VHL20
HTG4	1,00												
HTG6	0,51	1,00											
HTG7	-0,03	-0,19	1,00										
HTG8	0,52	0,48	-0,08	1,00									
HTG10	0,36	0,22	-0,03	0,43	1,00								
HMS2	0,57	0,42	0,09	0,81	0,28	1,00							
HMS3	0,25	0,27	-0,12	0,52	0,28	0,36	1,00						
HMS6	0,10	0,43	-0,04	0,46	0,12	0,26	-0,13	1,00					
HMS7	-0,13	-0,19	0,21	0,16	0,60	0,31	-0,14	-0,33	1,00				
ASB2	0,24	0,31	0,64	0,03	0,44	0,38	-0,24	-0,34	0,17	1,00			
AHT4	0,23	0,35	-0,10	0,31	0,68	0,43	-0,13	-0,31	0,31	0,18	1,00		
AHT5	0,41	0,28	0,30	0,22	0,37	0,41	-0,13	-0,32	0,20	0,52	0,13	1,00	
VHL20	0,08	0,46	0,29	0,14	0,33	0,36	-0,10	-0,10	0,23	0,49	0,34	0,32	1,00

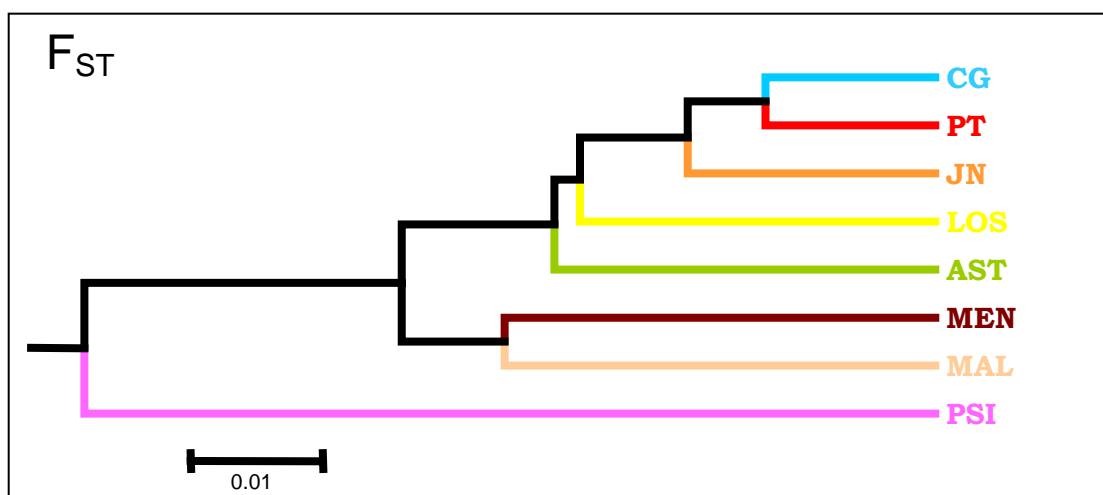
### V.5.2. Construcción de árboles filogenéticos.

Una vez obtenidas las dos matrices de distancias se construyeron sus correspondientes dendrogramas utilizando el método de agrupamiento UPGMA. En el caso de la distancia  $Da$  (Figura 5.23.) se construyó por medio del programa DISPAN, que permite aplicar un remuestreo bootstrap, mientras que para la distancia  $F_{ST}$  (Figura 5.24.) se utilizó el programa MEGA.

En ambos casos, las poblaciones del tronco norte de la península quedan agrupadas en un clado, las del tronco mediterráneo en otro, y alejada de las demás, la raza Pura Sangre Inglés.



**Figura 5.23.:** Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA a partir de la matriz de distancias genéticas  $D_a$ .

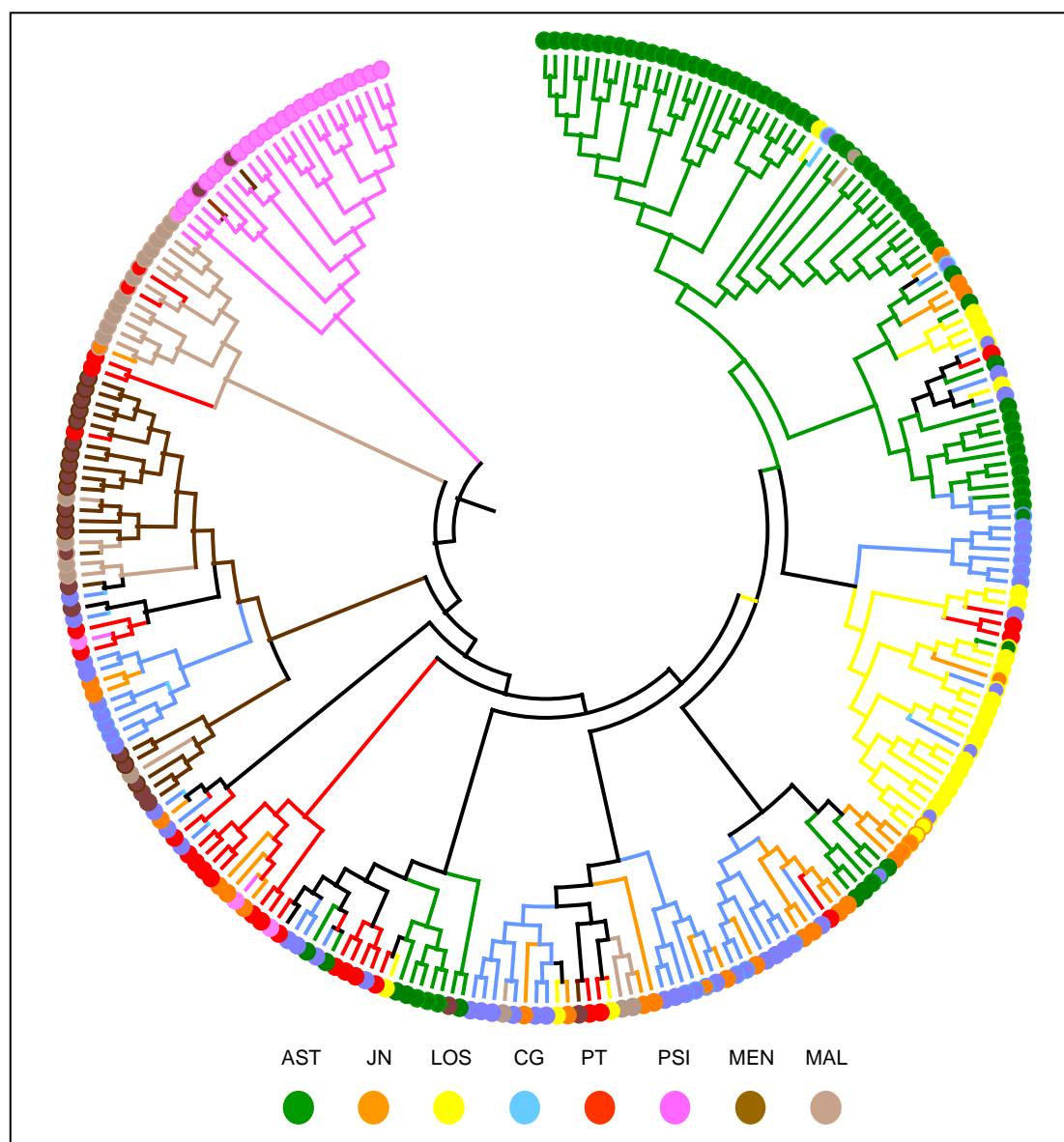


**Figura 5.24.:** Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA a partir de la matriz de distancias genéticas  $F_{ST}$ .

## V.6. Medidas de similitud entre individuos.

El resultado de aplicar la distancia de Bowcock a los 262 animales seleccionados, fue una matriz de 262x262, en la que cada fila y columna corresponde a un individuo. Mediante el programa MEGA la matriz se trató con el método de agrupamiento UPGMA y se generó el árbol de la Figura 5.25..





**Figura 5.25.:** Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA partiendo de la matriz de distancias genéticas de Bowcock entre pares de animales considerados como OTUs. Los 262 animales han sido seleccionados aleatoriamente (AST 67, JN 25, LOS 25, CG 50, PT 25, PSI 25, MEN 25 y MAL 20).

Las razas que mostraron estar mejor agrupadas fueron Asturcón, Losina, Menorquina, Mallorca y Pura Sangre Inglés. El resto de razas no se definen específicamente en un clado, sino que se muestran entremezcladas entre ellos.

## V.7. Análisis de Correspondencia.

En la Tabla 5.11. aparecen los valores del análisis factorial de correspondencia realizado sobre todas las poblaciones, con los valores de inercia alcanzados por cada factor.

**Tabla 5.11.:** Valores de inercia individual y acumulada de los cuatro factores principales cuando se analizan todas las poblaciones que forman parte del estudio.

Factor	% de inercia	% de inercia acumulado
1	32,37	32,37
2	21,66	54,03
3	14,27	68,30
4	13,20	81,51

En la Tabla 5.12., aparecen los valores de inercia que aporta cada raza al total. De todas las razas, la raza Pura Sangre Inglés es la que aporta un valor más alto, y Pottoka la que tiene menor aportación.

**Tabla 5.12.:** Valores de inercia aportados por cada raza.

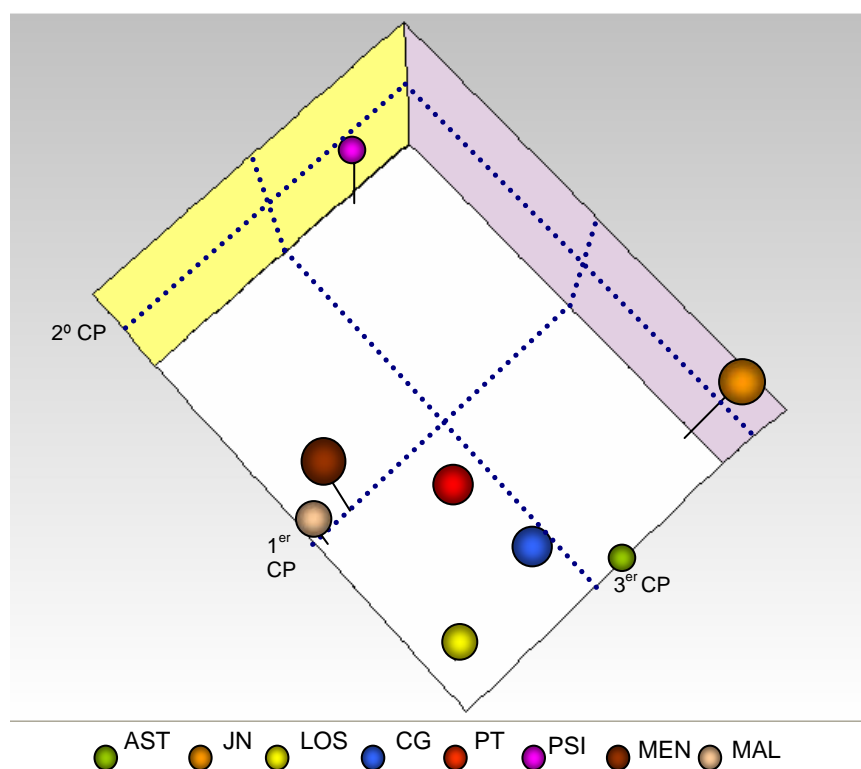
	AST	JN	LOS	CG	PT	MEN	MAL	PSI
% de Inercia	17,7	13,5	12,1	7,8	5,1	9,4	8,8	25,6

Los resultados del análisis de correspondencia aparecen ilustrados en las Figuras 5.26., 5.27. y 5.28..

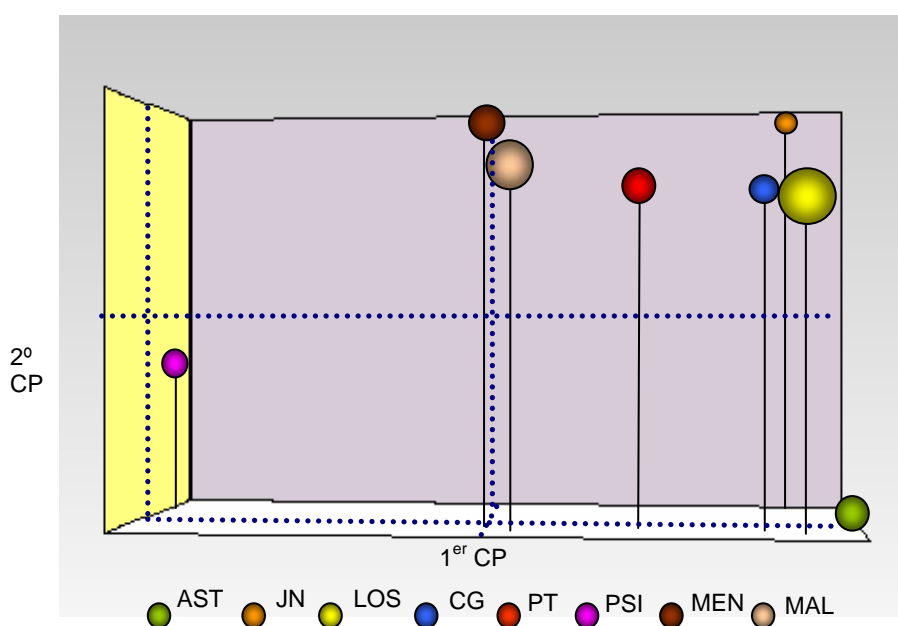
El primer factor, el cual acumula el 32,37% de la variabilidad observada en el espectro de las frecuencias alélicas entre las razas, discrimina claramente a la raza Pura Sangre Inglés del resto.

El segundo factor, que acumula el 21,66% de la variabilidad, también distingue entre la raza Pura Sangre Inglés y todas las demás excepto Asturcón, que queda en la misma mitad inferior. Por tanto la acción combinada de estos dos Componentes permitiría distinguir claramente tres grupos, por un lado la raza Pura Sangre Inglés, por otro la raza Asturcón, y un tercer grupo que combinaría al resto de las razas.

**Figura 5.26.:** Representación gráfica del análisis factorial de correspondencia de todas las razas considerando los factores 1 y 3.

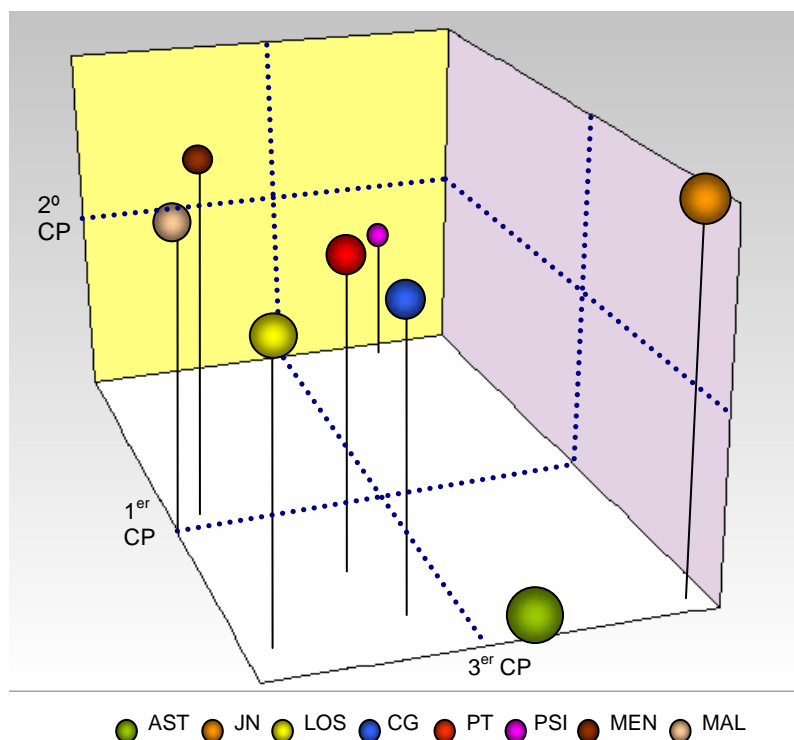


**Figura 5.27.:** Representación gráfica del análisis factorial de correspondencia de todas las razas considerando los factores 1 y 2.



El tercer Componente Principal es responsable del 14,1% de la variabilidad y discrimina a las razas Pura Sangre Inglés, Asturcón y Jaca Navarra, del resto.

**Figura 5.28.:** Representación gráfica del análisis factorial de correspondencia de todas las razas considerando los factores 1, 2 y 3.



En la Tabla 5.13. se detallan las contribuciones parciales a la inercia total de cada raza. Dentro del primer factor, la principal contribución proviene de la raza Pura Sangre Inglés con un 70,28%, que cómo ya se ha comentado es la que más claramente queda discriminada con el primer eje. En el caso del segundo factor, es la raza Asturcón la que contribuye más a la inercia, con un 60,99%, situación que también se veía claramente reflejada en la Figura 5.27. Y en el caso del tercer factor, las principales contribuciones a la inercia provienen de las razas Jaca Navarra y Losina, con un 43,37% y 34,69% respectivamente.

**Tabla 5.13:** Contribuciones de cada raza a la inercia total para los tres factores principales.

	AST	JN	LOS	CG	PT	MEN	MAL	PSI
Factor 1	12,23	6,00	2,49	1,65	0,59	4,58	2,17	70,28
Factor 2	60,99	22,54	1,67	2,43	1,96	4,24	1,18	4,99
Factor 3	0,68	43,37	34,69	2,85	2,68	6,29	5,07	4,36

Las contribuciones de los alelos más importantes se repartieron del modo siguiente:

- para la dimensión 1: alelo 171 del microsatélite HMS6 con una contribución del 12,63%, alelo 94 de HTG10 con 8,81% y alelo 150 de HMS3 con 8,75%.
- para la dimensión 2: alelo 222 del microsatélite HMS2 con una contribución del 5,53%, alelo 106 de HTG10 con 5,32%, y alelo 172 de ASB2 con 4,65%.
- para la dimensión 3: alelo 150 del microsatélite AHT4 con una contribución del 9,2%, alelo 161 de HMS6 con 4,87% y alelo 84 de HTG6 con 4%.

Dado que en este primer análisis la raza Pura Sangre Inglés ha sido la raza mejor discriminada por los tres primeros componentes principales, y puesto que fue introducida como *outgroup*, se ha realizado un segundo análisis donde queda excluida, para observar más detalladamente como funciona este análisis sobre el resto de razas autóctonas españolas.

En la Tabla 5.14. aparecen los valores del análisis factorial de correspondencia realizado sobre todas las poblaciones excepto Pura Sangre Inglés, con los valores de inercia alcanzados por cada factor.

**Tabla 5.14.:** Valores de inercia individual y acumulada de los cuatro principales factores cuando se analizan todas las poblaciones que forman parte del estudio excepto Pura Sangre Inglés.

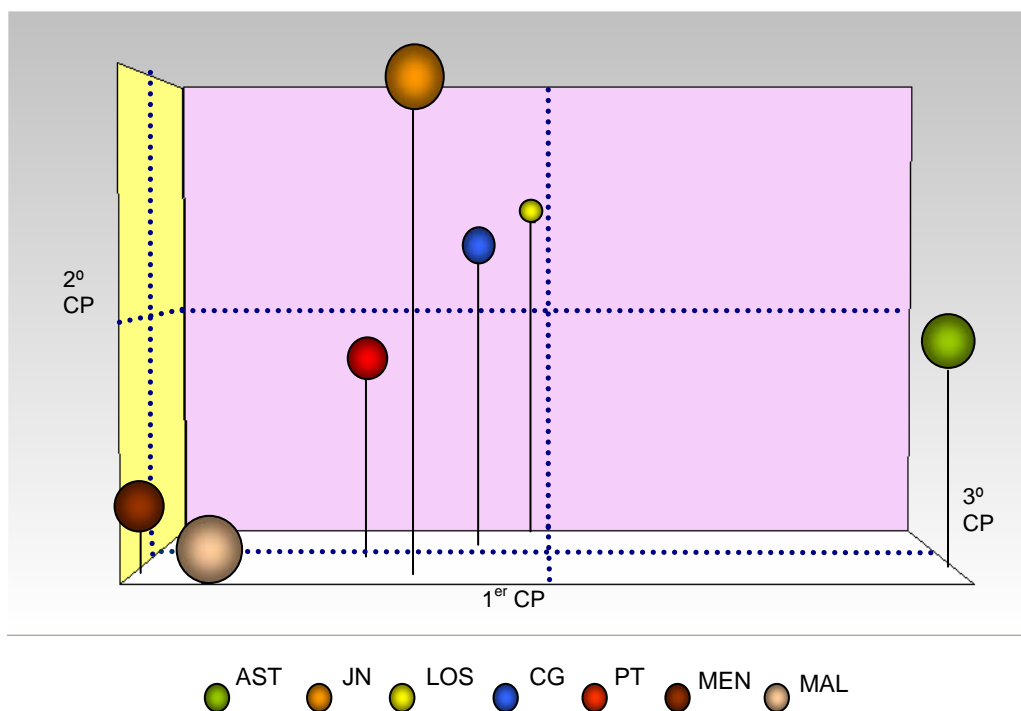
Factor	% de inercia	% de inercia acumulado
1	31,96	31,96
2	23,28	55,25
3	18,61	73,85
4	10,86	84,72

Los resultados de este segundo análisis aparecen en las Figuras 5.29., 5.30., y 5.31.

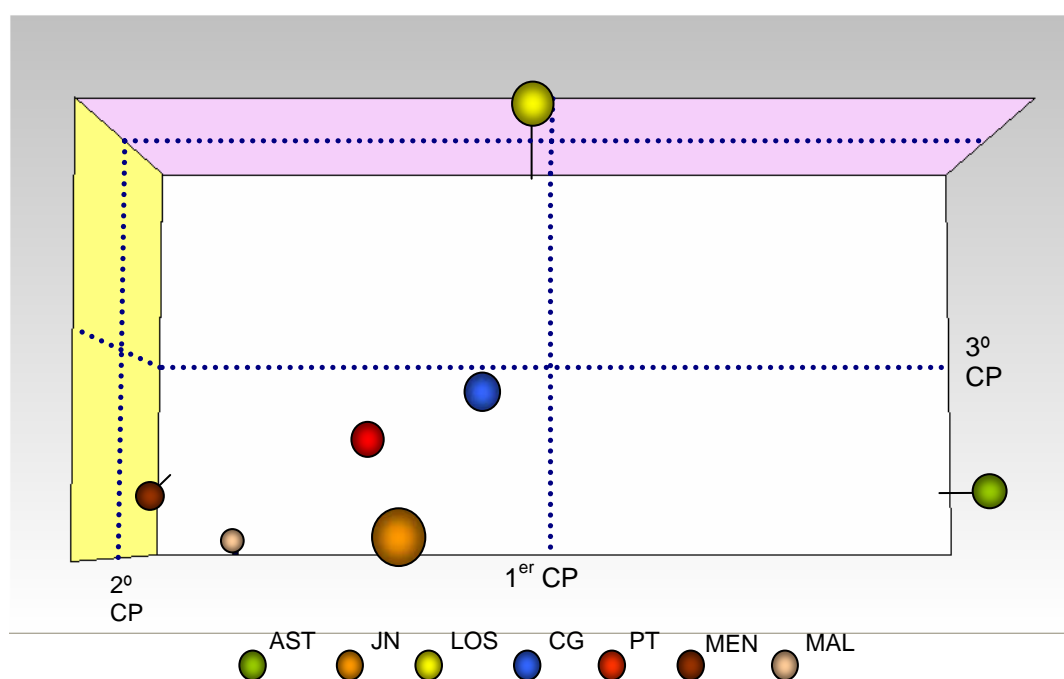
El primer Componente Principal es responsable del 32% de la inercia total, y discrimina claramente a la raza Asturcón de las restantes. El segundo eje explica el 23,3% de la inercia y diferencia a las razas mediterráneas del resto. El tercer

Componente explica el 18,6% de la inercia y en este caso es la raza Losina la que queda diferenciada de las demás.

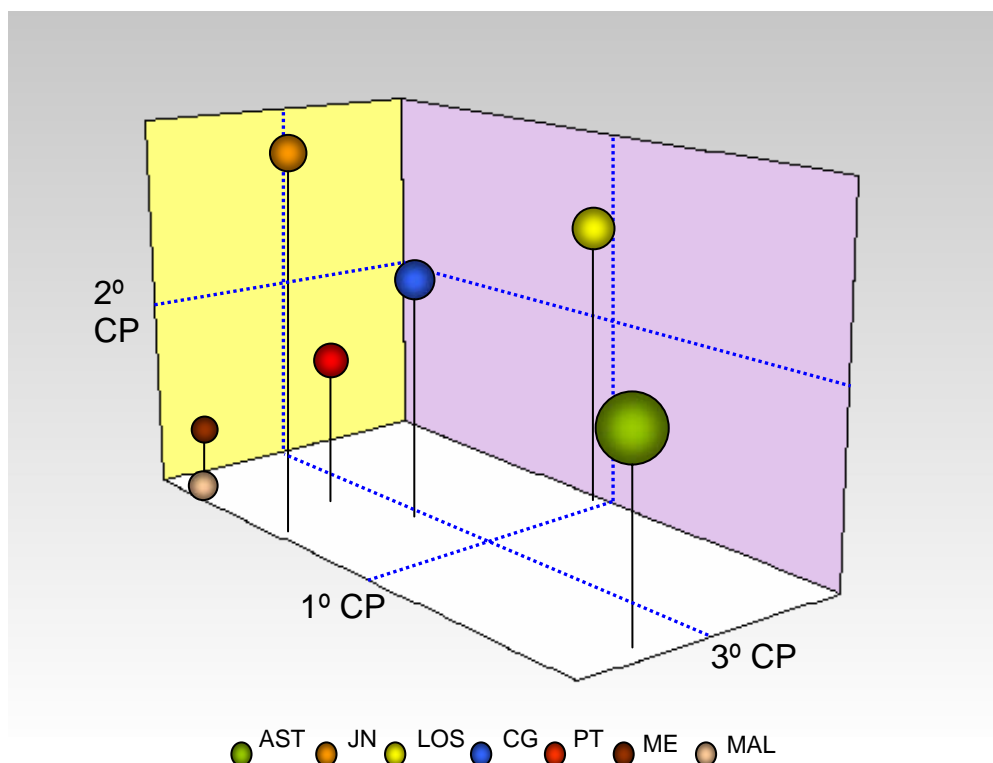
**Figura 5.29.:** Representación gráfica del análisis factorial de correspondencia de todas las razas excepto Pura Sangre Inglés considerando los factores 1 y 2.



**Figura 5.30.:** Representación gráfica del análisis factorial de correspondencia de todas las razas excepto Pura Sangre Inglés considerando los factores 1 y 3.



**Figura 5.31.:** Representación gráfica del análisis factorial de correspondencia de todas las razas excepto Pura Sangre Inglés considerando los factores 1, 2 y 3.



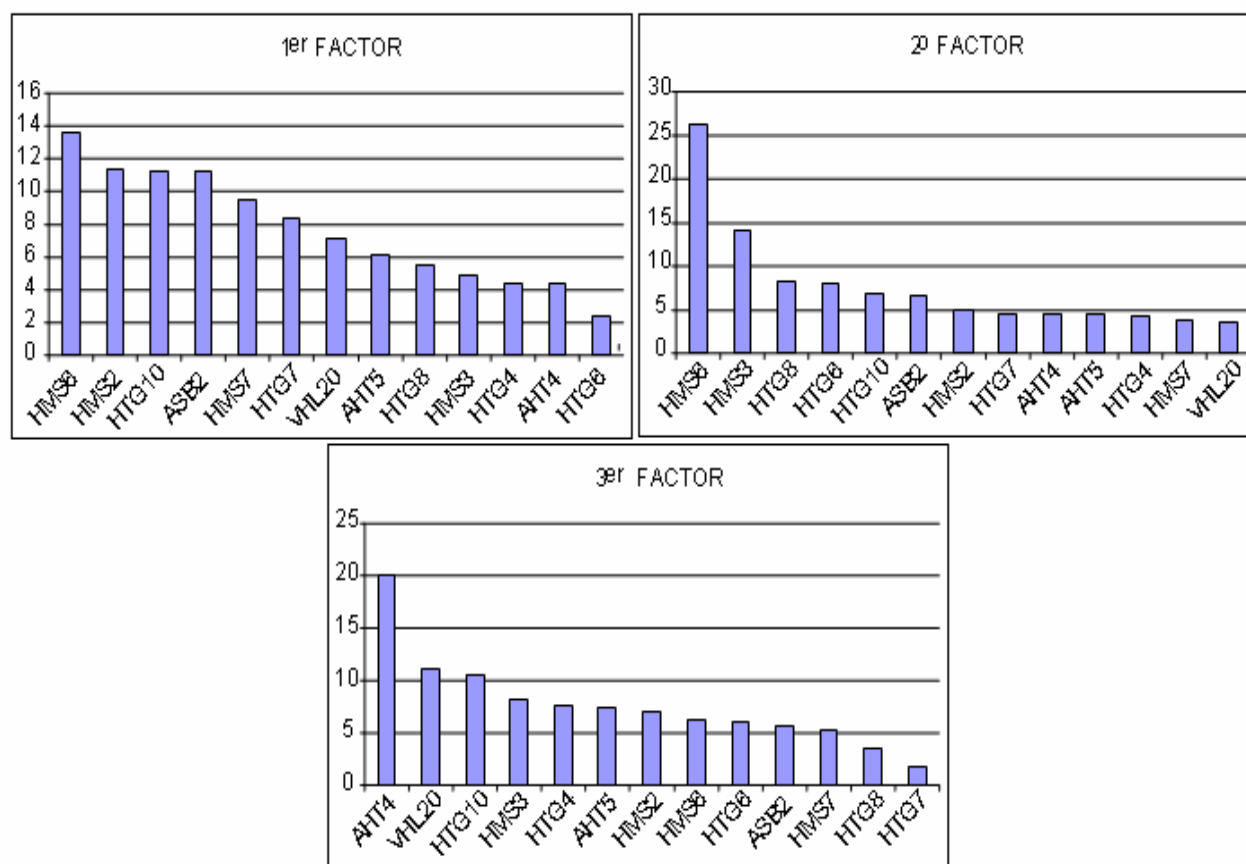
Las contribuciones parciales de cada raza a los tres primeros factores son las que aparecen en la Tabla 5.15. Como se puede ver la raza Asturcón, es la que aporta una mayor contribución a la inercia del factor 1 con un 64,5%, siendo esta raza la que mejor quedaba discriminada por este eje, como se aprecia en las Figuras 5.29. y 5.30. Para el segundo factor la mayor contribución proviene de la raza Jaca Navarra con un 46,6%, y las razas mediterráneas juntas con un 41,2%. El tercer factor tiene la mayor aportación a la inercia por parte de la raza Losina con un 74,4%.

**Tabla 5.15.:** Contribuciones de cada raza, excepto Pura Sangre Inglés, a la inercia total para los tres factores principales. En rojo aparecen los valores más altos.

	AST	JN	LOS	CG	PT	MEN	MAL
Factor 1	64,5	6,2	0,0	0,8	5,3	16,3	6,8
Factor 2	5,1	46,6	1,4	0,1	5,6	21,2	19,9
Factor 3	4,0	16,3	74,4	1,3	0,0	1,2	2,8

Las contribuciones de los alelos más importantes se repartieron del modo siguiente:

- para la dimensión 1: alelo 171 del microsatélite HMS6 con una contribución del 8,1%, alelo 222 de HMS2 con 4,7% y alelo 172 de ASB2 con 4,5%.
- para la dimensión 2: alelo 171 del microsatélite HMS6 con una contribución del 15,5%, alelo 161 de HMS6 con 6,2%, y alelo 158 de HMS3 con 6%.
- para la dimensión 3: alelo 150 del microsatélite AHT4 con una contribución del 10,3%, alelo 87 de VHL20 con 5,5% y alelo 112 de HTG10 con 4,8%.



**Figura 5.32.:** Contribuciones totales (porcentaje) de cada microsatélite al primer, segundo y tercer factor.

En la Figura 5.32. se muestra la aportación porcentual a las contribuciones totales de los microsatélites para los tres primeros factores. En el caso del primer factor, aparecen los tres mismos microsatélites que mostraron los alelos que más

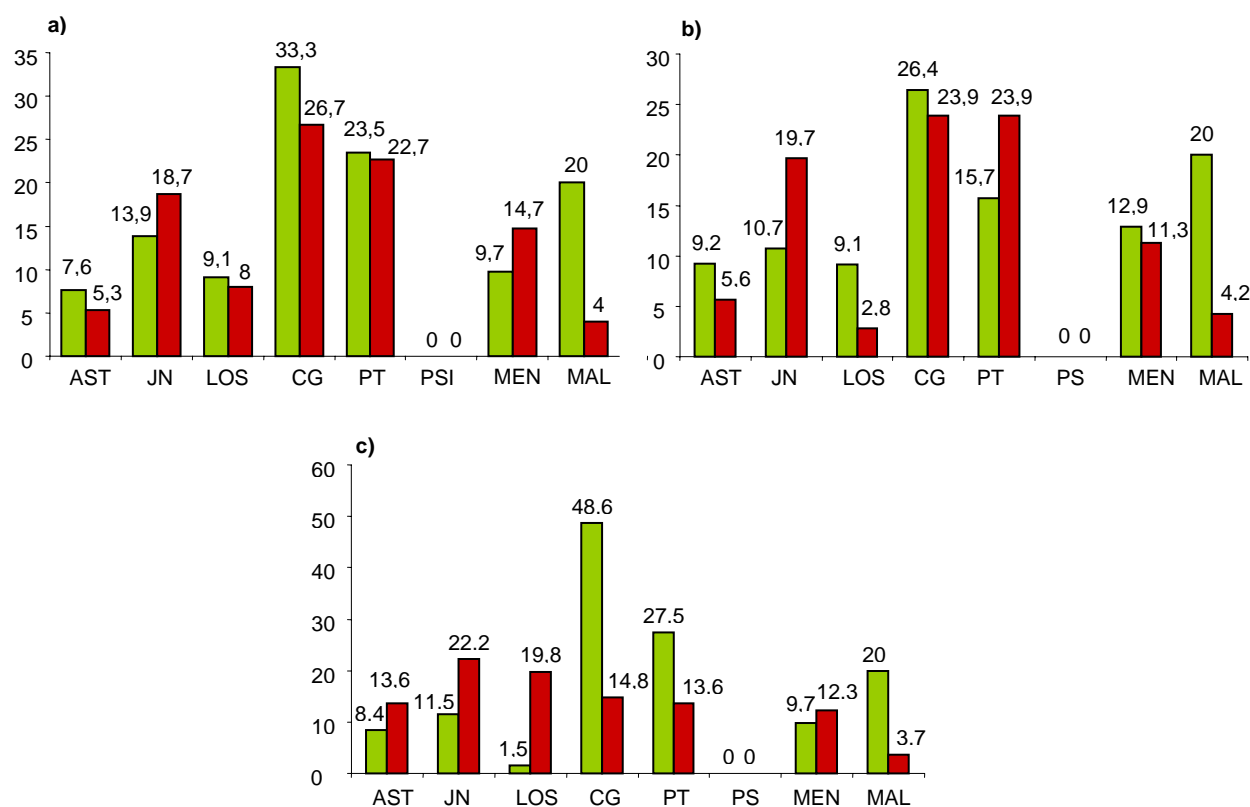


habían contribuido de forma individual, HMS6, HMS2 y ASB2; y esta misma situación es aplicable a los dos factores restantes.

### V.8. Asignación racial.

El porcentaje de individuos correctamente asignados fue de 86,14% y 86,88% por asignación directa con los métodos de frecuencias y Bayesiano respectivamente, y del 83,92% cuando se aplicó el método basado en la distancia  $D_a$  de Nei, que fue la distancia con mayor porcentaje de éxito en la asignación de individuos a la población correcta.

En la Figura 5.33. aparecen representados los tres métodos: con barras verdes el porcentaje de error con que los animales de cada raza son asignados a una población incorrecta (error tipo I), y con barras rojas, el porcentaje de error con que se adjudica a cada raza individuos que no le pertenecen (error tipo II).

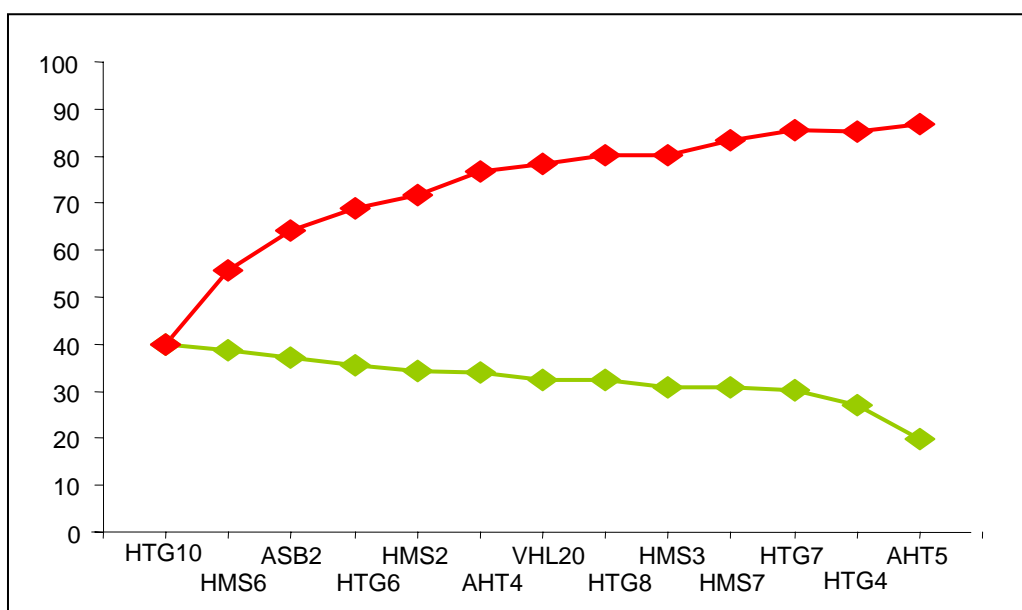


**Figura 5.33.:** Análisis de asignación racial mediante tres métodos: a) método de frecuencias, b) método Bayesiano, y c) método de distancia  $D_a$ . Con barras verdes aparece el porcentaje de error tipo I (individuos asignados a una población incorrecta) y con barras rojas el porcentaje de error tipo II (raza a la que se adjudican individuos erróneos).

Los resultados obtenidos al utilizar los métodos de frecuencias y Bayesiano son similares en la distribución de los errores de asignación. En ambos análisis el error tipo I presenta los porcentajes más altos en las razas Caballo de Pura Raza Gallega, Pottoka, y Mallorquina, mientras que el porcentaje de error tipo II más alto es para las razas Caballo de Pura Raza Gallega, Pottoka y Jaca Navarra. Como puede observarse Caballo de Pura Raza Gallega y Pottoka están presentes en los dos tipos de error con los porcentajes más altos.

Los resultados obtenidos basados en la distancia  $D_a$  de Nei, muestran que para el error tipo I, las tres razas con porcentajes de error más altos son Caballo de Pura Raza Gallega, Pottoka y Mallorquina, al igual que en los dos métodos anteriores. En el error tipo II, Jaca Navarra, Losina y Caballo de Pura Raza Gallega, son las razas con los errores más altos.

La raza Mallorquina es la raza con el error tipo II más bajo analizada con los métodos de frecuencias y de distancia. Con el método Bayesiano es la raza Losina la que cuenta con el error tipo II más bajo.



**Figura 5.34.:** Porcentaje de éxito en la asignación racial, por microsatélite (verde) y acumulada (rojo), utilizando el método Bayesiano.

Si individualizamos los porcentajes de asignación por microsatélite, el orden de mayor a menor porcentaje de éxito aparece en la Figura 5.34., serie verde. Los valores fueron obtenidos aplicando el método Bayesiano por el procedimiento de asignación

directa. El valor acumulado de un microsatélite y los anteriores a él aparece representado por medio de la serie roja. El microsatélite HTG10 es el que mayor porcentaje de éxito tiene en la asignación, con un 39,93%, mientras que AHT5 es el que presenta menor valor con un 19,96%. La acumulación de información de un microsatélite más otro, no siempre crece de acuerdo a los valores individuales, sino que la combinación particular de unos microsatélites con otros puede ser más o menos exitosa. Por ejemplo los valores acumulados de HTG10, HMS6, ASB2, HTG6, y HMS2 proporcionan un valor de 71,72% de eficacia en la asignación, pero si se sustituye el HMS2 por AHT4, que tiene un menor valor individual, la eficacia se eleva a 72,64%.

Dado que en la realidad las posibilidades de asignación van a estar reducidas a un número menor de razas, se han analizado las razas por parejas, además de realizarse otro análisis que incluye únicamente a las razas del tronco atlántico, que son las más próximas geográficamente.

Los resultados del análisis por parejas han demostrado porcentajes de éxito en la asignación mucho mayores, entre el 89,18%, que ha sido el valor más bajo, para las razas Jaca Navarra y Caballo de Pura Raza Gallega, y el 100% para las razas Losina y Caballo Mallorquín. Dentro de las razas del tronco atlántico, la pareja con mayor porcentaje de éxito en los valores de asignación correcta, corresponde a las razas Losina y Pottoka, con un 98,29%.

**Tabla 5.16.:** Porcentajes de éxito en la asignación de muestras anónimas a su raza de origen, considerando parejas de razas, por medio del método Bayesiano con el procedimiento de asignación directa. En rojo se destacan los valores más altos y en azul los más bajos.

	AST	JN	LOS	CG	PT	MEN	MAL
AST	100,00						
JN	95,85	100,00					
LOS	97,84	97,87	100,00				
CG	94,24	89,18	93,48	100,00			
PT	95,29	91,33	98,29	91,06	100,00		
MEN	99,33	98,04	98,97	96,18	95,12	100,00	
MAL	98,56	98,59	100,00	97,83	94,37	90,20	100,00

Los resultados del análisis que incluyen a las razas del tronco atlántico muestran un porcentaje de éxito de asignación medio por el método Bayesiano del 86,28%, muy próximo al valor del análisis que incluía todas las razas. Los microsatélites con mayor poder de asignación son HTG10, HMS6, y ASB2.

Usando el método Bayesiano, que es el que mostró mayor porcentaje de éxito, se calcularon las verosimilitudes para el genotipo de un individuo dado, bajo dos hipótesis: a) que el individuo pertenezca a la raza propuesta, y b) que el individuo no pertenezca a esa raza y sí a otra incluida dentro del grupo de las analizadas. Se simularon 100000 individuos y se estableció un nivel de significación de 0,01 para rechazar la hipótesis a consideración.

En la Tabla 5.17. se recogen los resultados (-log-verosimilitud) donde los genotipos se muestrean dentro de cada una de las razas y se calcula la verosimilitud de que pertenezcan a la raza de que han sido extraídos y la de que pertenezcan a cualquier otra raza, ej: Verosimilitud de Asturcón bajo la hipótesis de que sea Asturcón junto a la verosimilitud de que pertenezca a cualquier otra raza.

**Tabla 5.17.:** Media de la (-log-verosimilitud) de los genotipos muestreados desde una raza bajo la hipótesis de que pertenezcan a esa misma raza (A), y bajo la hipótesis a alguna de las otras razas consideradas en el estudio (B).

RAZAS	A	B
ASTURCÓN	14,2	18,1
JACA NAVARRA	13,6	17,7
LOSINA	14,1	16,2
CABALLO DE PURA RAZA GALLEGA	17,0	18,8
POTTOKA	15,5	16,1
MENORQUINA	15,0	17,8
MALLORQUINA	16,5	19,4
PURA SANGRE INGLÉS	11,7	19,7

En la Tabla 5.18. aparecen los resultados (-log-verosimilitud) donde los genotipos se muestrean para cada raza dentro del grupo del resto de razas y se calcula la verosimilitud de que pertenezcan a esa raza y que pertenezcan a cualquiera

de las otras razas, ej: Verosimilitud de no Asturcón bajo la hipótesis de que sea Asturcón junto a la verosimilitud de que pertenezca a cualquier otra raza.

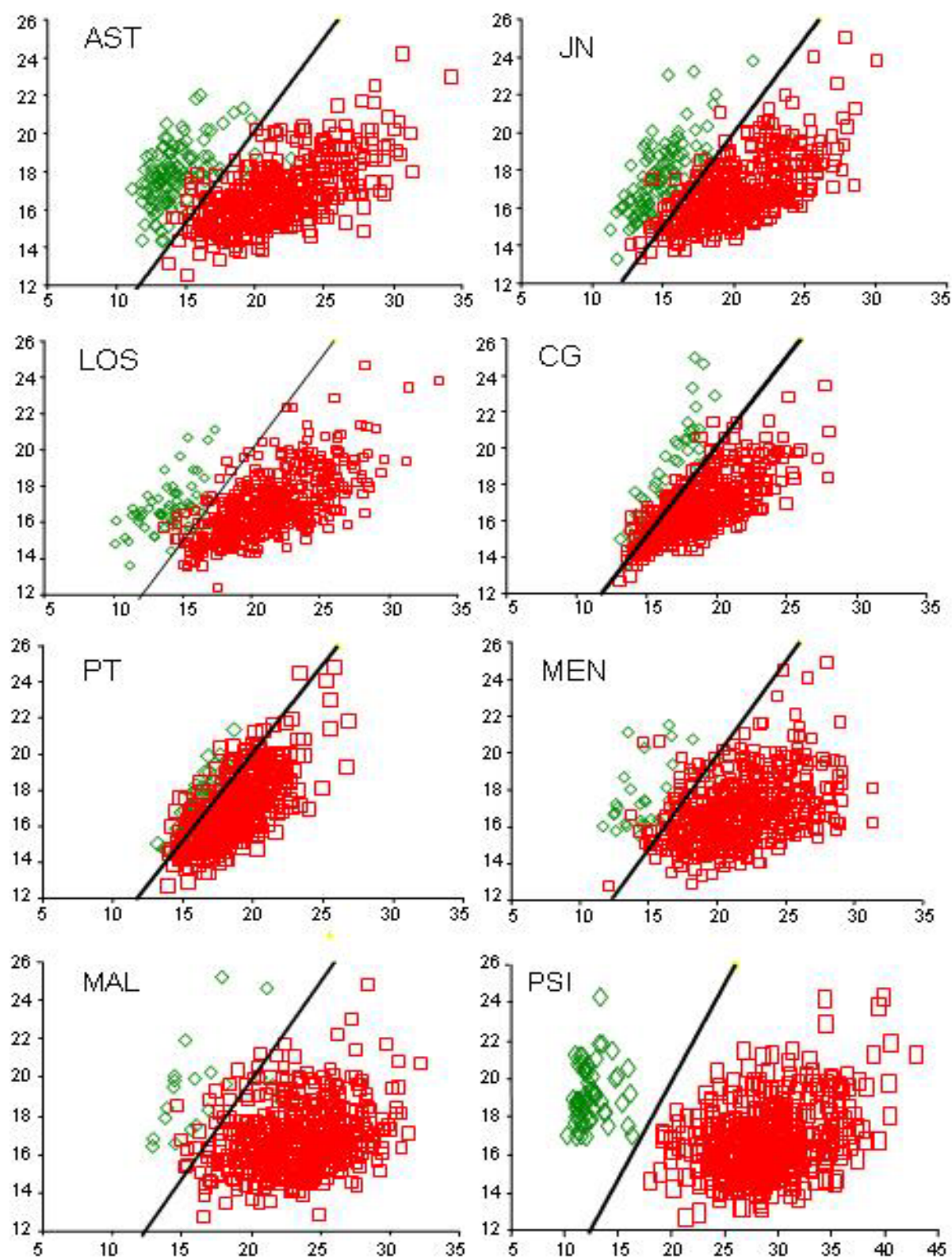
**Tabla 5.18.:** Media de la (-log-verosimilitud) donde los genotipos se muestrean para cada raza dentro del grupo del resto de razas y se calcula la verosimilitud de que pertenezcan a esa raza (C) y que pertenezcan a cualquiera de las otras razas (D)..

RAZAS	C	D
NO ASTURCÓN	21,9	16,8
NO JACA NAVARRA	20,4	16,9
NO LOSINA	21,4	16,9
NO CABALLO DE PURA RAZA GALLEGA	18,8	16,8
NO POTTOKA	18,6	16,8
NO MENORQUINA	21,7	16,8
NO MALLORQUINA	23,4	16,8
NO PURA SANGRE INGLÉS	29	16,7

La Figura 5.35. muestra gráficamente la información recogida en las Tablas 5.17. y 5.18. La nube de puntos verdes representa la información de las columnas A y B y la nube de puntos rojos representa la información de las columnas C y D.

Se ha trazado una recta  $x=y$ , que sirve para facilitar la discriminación visual del nivel de solapamiento entre las dos nubes de puntos. En todas las razas, con la excepción de Pura Sangre Inglés, se produce cierto solapamiento, que es más manifiesto en el caso del Caballo de Pura Raza Gallega y Pottoka, lo que está directamente correlacionado con el éxito en la asignación de los individuos. Cuanto más solapadas están las dos nubes de puntos más difícil resulta discriminar el origen verdadero de las muestras anónimas.

**Figura 5.35.:** Para cada raza en el eje  $x$  se representan  $(-\log\text{-verosimilitud})$  bajo la hipótesis de pertenencia a esa raza dada y en el eje  $y$  se representan  $(-\log\text{-verosimilitud})$  bajo la hipótesis de pertenencia al grupo del resto de razas. Los puntos verdes representan genotipos muestreados dentro de una raza y los puntos rojos representan genotipos muestreados dentro del grupo del resto de razas.





## **VI. DISCUSIÓN**



## VI. DISCUSIÓN

El caballo es una de las especies domésticas sobre la que menos esfuerzos económicos se han invertido para el estudio de su genoma, y como resultado de esta circunstancia su estado actual es pobre si se compara al de otras especies de animales domésticos. Existen diversas razones para esta falta de inversión. El caballo hoy en día ha perdido gran parte de sus utilidades ancestrales, como medio de transporte y agente agrícola o militar destinado a las guerras y combates, y ha quedado relegado a actividades deportivas o de ocio. Además los costes de investigación de los patrones de herencia en este tipo de animales son altos, así como el tiempo necesario para su estudio.

Un ejemplo del retraso existente en el estudio del genoma equino se puede observar en la Tabla 6.1., que resume parte de la información que sobre el estado del genoma de especies domésticas como bovino y equino se hace pública en la base de datos del centro de investigación del INRA, en Francia.

**Tabla 6.1.:** Estado actual de conocimiento del genoma equino según datos recogidos por el INRA (Institut National de la Recherche Agronomique).

INRA	Bovino	Equino
Loci descubiertos / Loci asignados	4344 / 4109	1275 / 1021
Genes / Genes asignados	1554 / 1503	430 / 408
STR /STR asignados	2402 / 2241	735 / 507
Polimorfismos	3100	1016
Referencias en SWISSPROT	620	46
Referencias bibliográficas	956	163
Referencias en GenBank EMBL	4578	983

Como se puede observar en la Tabla 6.1., en la mayoría de los campos descritos, el conocimiento del genoma equino, supone apenas una cuarta parte del genoma bovino. Esta situación es importante puesto que a partir de un mayor conocimiento del genoma se desprenden principalmente dos tipos de estudio: aquéllos dirigidos a una mayor comprensión de los procesos evolutivos de las especies y por otro lado a la identificación de genes mayores o QTLs que permitan la identificación de caracteres productivos o responsables de patologías.

En los últimos años, esta situación está cambiando y están surgiendo más publicaciones que tratan de compensar estas carencias, por medio del desarrollo de mapas de ligamiento (Lindgren y col., 1998; Guérin y col., 1999; Swinburne y col., 2000), mapas sinténicos (Shiue y col., 1999) y paneles de radiación (Kiguwa y col., 2000; Chowdhary y col., 2002; Chowdhary y col., 2003), así como mapas citogenéticos, habiendo pasado de 40 marcadores localizados en 1998 a 150 en el 2001 (Godard y col., 2000; Hirota y col., 2001; Lear y col., 2001, Lindgren y col., 2001; Mariat y col., 2001; base de datos HORSEMAP <http://locus.jouy.inra.fr/> (INRA) y Horsebase <http://thearkdb.org/> (Roslin Institute))

Sin embargo, este dato en principio desalentador, no puede hacernos obviar algunas de las razones que han de justificar una mayor inversión futura en el estudio del genoma de esta especie. Entre estas razones se encuentra una potenciación de los recursos genéticos que poseen las especies a través de la diversidad de las razas.

Las razones básicas para la conservación de las razas de caballo doméstico se pueden clasificar en tres: razones genéticas, razones históricas y culturales y razones científicas.

Dentro del primer grupo, están aquellas que ven las razas como una garantía de futuro, de modo que la variabilidad conservada en la actualidad pueda ser útil en un futuro cuando surjan cambios en el tipo de individuos que se demandan. Hay que tener en cuenta que gran parte de las razas de caballos actuales han sufrido un proceso largo de adaptación a muy diversos habitats, y por tanto su genoma posee una amplia gama de la información necesaria para la supervivencia bajo la selección natural y artificial en condiciones muy diferentes.

El segundo tipo de razones, históricas y culturales, han sido en numerosas ocasiones ignoradas de forma egoísta. En estas razones recaería una de las vías para no olvidar el pasado y de este modo devolver a la naturaleza lo que ella nos ha brindado durante un largo período de tiempo. En el caso de los caballos, es difícil desligar la memoria histórica de los movimientos migratorios humanos asociados a los caballos como medios de transporte. Estos animales forman parte del patrimonio natural y cultural de los pueblos, y es justo tratar de perpetuarlos para conocimiento de las generaciones futuras.

En este sentido, la totalidad de las razas que conforman este estudio presentan un enraizamiento profundo en las costumbres y tradiciones de las zonas geográficas donde se asientan, y su desaparición sin duda, causaría una gran pérdida de la identidad del pueblo que las acoge.

El tercer tipo de razón, es que poblaciones diferentes poseen variantes genéticas distintas. Si estas variantes desaparecen la posibilidad de avance científico disminuye.

Con el objetivo de ampliar los conocimientos sobre la diversidad genética de multitud de razas de diferentes especies se han desarrollado numerosos trabajos basados en el uso de distintas técnicas, cuyos resultados aportan una información muy valiosa a la hora de plantearse estrategias de conservación, y que pueden servir de modelo para futuras razas aún sin estudiar, salvaguardando las diferencias particulares de cada situación.

Para conocer cuales son las expectativas de futuro de muchas razas es necesario conocer profundamente cual es su situación actual, siendo éste un trabajo que engloba numerosas materias, y entre ellas una muy importante, es su *“estado genético”*.

#### **VI.1. Variabilidad genética dentro de razas.**

Los marcadores seleccionados en este trabajo por su acreditación en otros laboratorios y por el organismo ISAG, han demostrado ser adecuados para este estudio por su nivel de polimorfismo en todas las razas analizadas.

El número de alelos encontrado para cada loci en cada raza, es un buen indicador de la diversidad genética de una raza, pues una de las primeras consecuencias cuando se reduce el tamaño efectivo de una población es la reducción del número de alelos detectados y la pérdida en primera instancia de aquellos alelos que presentaban frecuencias más bajas (Nei y col., 1975).

El comportamiento de las razas en cuanto al número de alelos observados para todos y cada uno de los microsatélites analizados, ha sido diferente para un nivel de significación de  $P < 0,05$ . Destacan Jaca Navarra y Caballo de Pura Raza Gallega por tener el número de alelos totales más altos (Tabla 5.1.). Las máximas diferencias entre

las poblaciones se observaron en el locus HMS2 entre Asturcón y Jaca Navarra, con 9 alelos cada una, frente a la raza Mallorquina, con 4 alelos, y en el microsatélite ASB2, entre Losina, con 10 alelos, y Mallorquina, con 5 alelos.

El número de alelos observado ha estado más condicionado por el microsatélite estudiado, que por la raza analizada (Tabla 5.1.). Por ejemplo, el microsatélite HTG10 ha mostrado un número de alelos entre 8 y 10 en todas las razas, frente al HTG7 que no ha superado los cinco alelos.

Existen otros estudios de poblaciones equinas, analizadas con gran parte de los microsatélites incluidos en este trabajo y que muestran resultados similares como puede deducirse del análisis de la Tabla 6.2. donde aparecen los resultados obtenidos en la raza de caballo criollo uruguayo (Kelly y col., 2002), una raza austriaca en peligro de extinción, *Noriker*, (Aurich y col., 2003), y Pura Sangre Australiano (Breen y col., 1994). Naturalmente esta coincidencia en el número final de alelos totales de estas razas con las razas autóctonas españolas de este estudio, no implica una coincidencia ni en los alelos detectados ni en su frecuencia alélica, pero si expresa una tendencia particular de algunos de los microsatélites empleados, a mutar más fácilmente y de este modo generar un número más alto de alelos con independencia de la raza analizada.

Esta es la situación encontrada en otras razas de la especie *Equus caballus*, pero análisis realizados en razas de la especie *Equus asinus* con los mismos microsatélites, como son algunas razas autóctonas españolas incluidas en el trabajo de Aranguren\_Méndez y col. (2001) (Tabla 6.2.), demuestran que el nivel de polimorfismo dentro de los microsatélites no siempre es constante. Este hecho contribuye a la teoría difundida sobre la inestabilidad de los microsatélites en procesos evolutivos largos como son las especiaciones, y cuestiona su utilización como marcadores de elección a la hora de reconstruir filogenias que impliquen especies distintas.

**Tabla 6.2.:** Número de alelos observados en las razas de caballos: Criollo Uruguayo, Noriker, Pura sangre Australiano y las razas autóctonas españolas (media de los valores individuales), y en una mezcla de razas de la especie *Equus asinus* (Andaluza, Catalana, Encartaciones, Mallorquina y Zamorano-Leonesa).

	HTG4	HTG6	HTG7	HTG10	HMS2	HMS3	HMS6	HMS7	ASB2	AHT4	AHT5	VHL20
RAZAS ESPAÑOLAS	6	6	4	9	7	7	6	7	8	8	6	9
CRIOLLO URUGUAYO	4	5	5	-	7	7	8	6	7	6	-	-
RAZA NORIKER	7	5	4	9	7	7	6	7	7	6	8	9
PURASANGRE AUSTRALIANO	4	-	-	6	-	7	4	6	-	-	-	7
RAZAS <i>Equus asinus</i>	5	11	13	12	10	7	6	7	-	15	14	4

Algunos de los alelos observados son exclusivos de raza. Las razas con más alelos exclusivos son Jaca Navarra y Caballo de Pura Raza Gallega con 4 y 5 alelos exclusivos, sin embargo ninguno de los alelos exclusivos encontrados supera una frecuencia del 5%, lo cual, según la teoría neutralista de Kimura (1983), sería una consecuencia de mutaciones recientes que han ocurrido después de la divergencia, o por la introducción de sangre procedente de otras razas, dándose la circunstancia de que en el caso de estas dos razas la creación del Libro Genealógico es reciente y la diversidad de morfotipos aceptados más alta que para el resto de las razas.

Algunos de estos alelos exclusivos, como es el caso del alelo 141 del microsatélite HTG4 en la raza Caballo de Pura Raza Gallega, se encuentran en uno de los dos extremos de la distribución unimodal del locus (Figura 5.8.). Esta imagen se correspondería con un proceso mutacional tipo SMM, donde partiendo de un alelo inicial con  $n$  repeticiones, que mostraría una de las frecuencias alélicas más altas, se van generando nuevos alelos por pérdida o adición de una repetición, con frecuencias cada vez más bajas.

El otro tipo de distribución, polimodal, con dos o más alelos con frecuencias altas, alejados por más de una repetición, también presenta alelos exclusivos de raza.

Este es el caso de los alelos 230 y 236, del microsatélite HMS2, presentes en exclusividad en las razas Mallorquina y Jaca Navarra, respectivamente (Figura 5.13.). Este tipo de distribución estaría más ajustada a un tipo de modelo mutacional IAM, donde se pueden generar alelos con más de dos repeticiones de diferencia respecto al alelo de partida, en un sólo evento mutacional.

Si tenemos en cuenta que las poblaciones estudiadas pertenecen a razas con tiempos de divergencia relativamente cortos, el número de alelos observados en cada una no es el principal parámetro diferenciador, y son las frecuencias alélicas las que permiten apreciar las mayores diferencias entre las razas, como consecuencia principalmente de la acción de la deriva genética.

Las mayores diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas se observan entre la raza Pura Sangre Inglés y el resto, y dentro de las razas españolas, entre las razas del tronco atlántico y las mediterráneas. En el análisis de un grupo reducido de muestras, agrupadas en los dos troncos más alejados geográficamente (atlántico y mediterráneo), se observó además de una pérdida de algunos alelos que se encontraban a muy baja frecuencia, la aparición de otros alelos exclusivos de tronco, distintos a los anteriores. La mayoría de estos alelos exclusivos se presentan a muy baja frecuencia, pero destaca sobre todos el alelo 167 del microsatélite HMS6, perteneciente al tronco atlántico, con una frecuencia del 14%.

#### VI.1.1. Heterocigosis

Los valores de heterocigosis observada y esperada también fueron similares entre todas las razas analizadas siendo el valor medio de  $H_o$  de 72%, con extremos entre el 70% de la raza Mallorquina, y el 75% de la Menorquina. Este último valor es el más sorprendente si pensamos que la raza Menorquina es la segunda raza con menor número de alelos, exceptuando la raza Pura Sangre Inglés, pero puede estar justificado en el elevado número de animales, más de 300, que se emplearon como reproductores cuando se decidió recuperar la raza. Del mismo modo sorprende la similitud entre los valores encontrados en las razas Asturcón, Losina, Jaca Navarra y Caballo de Pura Raza Gallega, las cuales además de contar con diferencias notables entre sus censos, se han gestionado de forma muy diferente desde el punto de vista reproductivo. En el caso de Asturcón y Losina, el control de cruzamientos ha sido más estricto que en las otras dos razas, ya que la raza Asturcón cuenta con un Libro

genealógico desde el año 1981 y la raza Losina está gestionada bajo el criterio de un solo criador, mientras que Jaca Navarra y Caballo de Pura Raza Gallega cuentan con Libros Genealógicos mucho más recientes y además en el segundo caso el sistema productivo extensivo, con suelta de los animales al monte durante todo el año, no permite un control de los cruces.

Comparando los valores de heterocigosis observada encontrados en este estudio, con los de otras razas de caballos que han sido analizadas con un panel de microsatélites similar, los valores de las razas autóctonas españolas son similares o más altos. Cunningham y col. (2001) encuentran un valor del 62,8% en la muestra poblacional de la raza Pura Sangre Inglés analizada, 64,2% en la raza Shetland, 65,4% en una raza egipcia y 67,1% en una raza turca. En la raza de criollo uruguayo (Kelly y col., 2002) el valor encontrado fue de 35,3%, y de 64% en la raza Noriker (Aurich y col., 2003).

En razas de otras especies domésticas se encontraron valores parecidos. Hanslik y col. (2000) encontraron en 6 razas bovinas de distribución mundial, valores más bajos, entre el 35% y el 50%, con un análisis de 39 microsatélites; debido probablemente al hecho de tratarse de razas que llevan mucho tiempo genéticamente aisladas, cuyos orígenes se encuentran en un pequeño número de individuos fundadores y con presiones selectivas altas. Los valores encontrados por Maudet y col. (2002) en cuatro razas bovinas locales francesas fueron más altos, de 64,3% a 69,3%, ya que en estos casos la proporción entre reproductores machos y hembras es más alto: 1 macho para 50 hembras en la raza Abondance, frente a 1 macho para 1550 hembras de la raza Holstein francesa. En el caso de algunas razas de ovino, como las dos razas portuguesas analizadas por Oliveira y col. (2003) los valores variaron entre 68 y 71%.

Por tanto, a pesar de que la raza Pura Sangre Inglés cuenta con un censo superior al de nuestras razas autóctonas, los valores de heterocigosis observada son más bajos, como consecuencia probablemente del origen de la raza, fundamentada en tres sementales, y también a su gestión posterior, donde la presión selectiva ha incrementado los niveles de endogamia y esto ha dado lugar a una pérdida de la diversidad genética. En el caso de las razas autóctonas a pesar de contar con un censo mucho más bajo tienen su origen en un número superior de reproductores, y esto

unido a manejos reproductivos con presiones selectivas muy bajas, ha dado lugar probablemente a valores de heterocigosis observada más altos.

El comportamiento de la  $H_e$  es similar a la  $H_o$ , siendo su valor medio del 73%, con extremos entre el 70% y 77% para las razas españolas. En el trabajo de Cunningham y col. (2001) los valores de  $H_e$  fueron del 64,6% para la muestra de Pura Sangre Inglés, 66,1% para la raza Shetland, 69,1% para la raza egipcia y 73,2% para la raza turca. La raza de caballo criollo uruguayo analizada por Kelly y col. (2002), continuó mostrando valores notablemente bajos respecto a las restantes, 34,6%. En el caso de especies salvajes como los leopardos, Uphyrkina y col. (2001) encontraron valores de  $H_e$  entre el 35,6% y el 80,3%. En las poblaciones humanas los valores de  $H_e$  encontrados son más altos que en las especies domésticas, 76% en muestras del continente africano, 70% en las asiáticas y 73% en las europeas. Esta diferencia entre poblaciones humanas y especies domésticas es consecuencia de que en las especies domésticas el cruzamiento no suele ser aleatorio y normalmente tienen una base genética limitada (Fredholm y Winterö, 1995).

Los valores de  $F_{IS}$  permiten detectar si una población tiene defecto o exceso de heterocigotos. Las razas Jaca Navarra, Caballo de Pura Raza Gallega, Pottoka y Raza Mallorquina, muestran valores indicativos de un déficit de heterocigotos, destacando especialmente Caballo de Pura Raza Gallega, que tiene déficit de heterocigotos para todos los microsatélites excepto dos, y que se puede explicar por niveles de endogamia altos como consecuencia de cruzamientos no aleatorios, lo que contrasta con el régimen de explotación de la raza, que se desarrolla en extensivo. Por tanto, parece más probable que el origen del déficit de heterocigotos esté en una subestructuración reproductiva (efecto Wahlund) al igual que ocurre en el resto de las razas con déficit de heterocigotos.

Analizando el déficit de heterocigotos por microsatélite, el microsatélite HMS3 es sin duda el que arroja el resultado más llamativo, ya que evidencia déficit de heterocigotos en todas las razas, siendo además el único significativo ( $P < 0,01$ ). Una explicación a este hecho, que se comenta más ampliamente en el párrafo dedicado al equilibrio Hardy-Weinberg, radicaría en la presencia de alelos nulos. Por esta razón se realizó un segundo análisis sin tener en cuenta los genotipos aportados por el microsatélite HMS3 y a pesar de ello los resultados fueron los mismos, Jaca Navarra,



Caballo de Pura Raza Gallega, Pottoka y la Raza Mallorquina, mantienen un déficit global de heterocigotos.

El valor final de  $F_{IS}$  encontrado en la totalidad de las razas para todos los microsatélites también fue positivo y significativo ( $P < 0,05$ ), lo que demuestra un exceso significativo de heterocigotos para el conjunto de las poblaciones estudiadas.

#### VI.1.2. Equilibrio Hardy-Weinberg

El análisis de equilibrio Hardy-Weinberg realizado con dos pruebas diferentes muestra que Jaca Navarra, Losina y Caballo de Pura Raza Gallega se encuentran en desequilibrio, quedando excluido de este grupo la raza Mallorquina, que era una de las dos razas con mayores diferencias entre la heterocigosis observada y esperada.

En el caso de la Jaca Navarra y probablemente también en el del Caballo de Pura Raza Gallega, parece tener un papel clave en la situación de desequilibrio Hardy-Weinberg, el microsatélite HMS3. Este es el único marcador en desequilibrio en la primera raza y está también presente junto al AHT4, en la segunda raza mencionada. Como se puede apreciar en la Tabla 5.3., el microsatélite HMS3 es el único marcador que presenta un déficit de heterocigosis observada con respecto a la esperada en todas las razas analizadas, circunstancia que se hace más manifiesta en la Jaca Navarra con un 22% de diferencia entre ambas. Una posible explicación a este hecho, podría encontrarse en la presencia, como ya hemos resaltado, de alelos nulos, con lo que se estarían genotipando como homocigotos, animales que en realidad son heterocigotos. Este fenómeno ya ha sido descrito por Achmann y col. (2001), quienes detectaron una menor intensidad de amplificación del alelo 158 como consecuencia de una mutación en el cebador *reverse*, donde se producía una transición de G/A, con la consiguiente complejidad a la hora de discriminar el alelo 158 respecto a la primera *stutter band* o banda sombra del alelo 160. Además de la presencia de este alelo nulo, los autores también detectaron una circunstancia similar en el microsatélite ASB2, pero en este caso era el cebador *forward* (5'-3') el afectado, que no coincide con el utilizado en este trabajo, con lo que no existe indicio alguno de que este artefacto haya podido condicionar los genotipados realizados para este microsatélite.

En el caso de la población de caballo criollo uruguayo, Kelly y col. (2002) utilizando 9 de los microsatélites incluidos en este estudio, describen una situación de desequilibrio Hardy-Weinberg para un nivel de significación de  $P < 0,05$ , en los microsatélites HMS3, HMS2 y HTG4, contribuyendo una vez más a la idea de que la mutación descubierta por Achmann y col. (2001) en caballos Lipizanos, y también presente en los ponis Galés y Piebald, podría estar presente en un número más amplio de poblaciones. No obstante, sería necesaria una confirmación de este fenómeno por medio de genealogías contrastadas con posterior secuenciación, para poder emitir un resultado fundamentado.

En el caso del estudio realizado por Bjornstad y Roed (2001) sobre cuatro razas nativas noruegas (Fjord, Nordlan/Lyngen, Dole y Coldblooded Trotter) y caballo Islandés, poni Shetland, Standardbred y Pura Sangre Inglés, no se incluyeron en el estudio los microsatélites HMS3 y HTG10, porque cuatro de estas razas presentaban desviaciones notables del equilibrio Hardy-Weinberg.

Considerando todas las poblaciones como una, los microsatélites que se encuentran en desequilibrio Hardy-Weinberg son, por supuesto HMS3, y además HTG10 y AHT4.

Por esta razón, se realizó un segundo análisis de equilibrio Hardy-Weinberg con el programa GENEPOP, esta vez sin tener en cuenta los genotipos del microsatélite HSM3, y se encontró que en ninguna de las razas, excepto la raza Losina, presentaba desviaciones significativas ( $P < 0,01$ ) con respecto al equilibrio, aunque esta raza tampoco antes mostraba una desviación significativa para el microsatélite HMS3.

El déficit de heterocigotos calculado como  $F_{IS}$ , se efectuó de nuevo excluyendo los valores del microsatélite HMS3, pero los resultados continuaron siendo los mismos, lo que demuestra que el déficit de heterocigotos, no solo debe ser consecuencia del posible alelo nulo de este microsatélite, sino además por una estructuración poblacional que no se ha tenido en cuenta o por una contribución desigual de uno de los dos sexos a la descendencia.

Por tanto, sería recomendable conocer cuales son las razones verdaderas por las que este microsatélite muestra este desequilibrio, antes de decidir incluirlo en futuros

estudios. Para realizar esta labor es necesario contar con genealogías contrastadas, a través de las cuales es posible realizar un estudio de heredabilidad por descendencia del alelo nulo, estando esta información disponible tan solo en el caso de la raza Asturcón.

## **VI.2. Análisis de cuello de botella.**

La práctica totalidad de razas autóctonas estudiadas en este trabajo, son poblaciones que constan de un censo reducido de animales, y aunque en algunos casos muestran síntomas de recuperación, su situación puede considerarse en muchos casos crítica y están en peligro de desaparición. Además en muchas de ellas, la constitución del Libro Genealógico es reciente, y por tanto el seguimiento y control de los cruzamientos entre reproductores no ha estado dirigido a minimizar los niveles de endogamia.

Por esta razón, se ha llevado a cabo un análisis cuyo objetivo es determinar si alguna de estas poblaciones ha atravesado en las pasadas generaciones un cuello de botella, puesto que cuanto más recientemente haya ocurrido el cuello de botella, mayores son las posibilidades de reducir los efectos negativos de este fenómeno, bien a través de cruzamientos dirigidos, o incluso introduciendo migrantes en las poblaciones.

Los análisis utilizados tienen la ventaja de que no necesitan información sobre tamaños poblacionales o niveles de variación genética anteriores a las actuales y tan sólo requieren conocer las frecuencias alélicas de 5 a 20 loci sobre un tamaño poblacional de aproximadamente 30 animales, requisitos que cumplen las poblaciones de este estudio en la mayoría de los casos.

Se considera que una población no ha atravesado un cuello de botella cuando los loci neutros a la selección, como los microsatélites, se encuentran en una situación de equilibrio mutación-deriva, circunstancia que se manifiesta porque existe una alta proporción de alelos a baja frecuencia (0,001-0,100), superando a aquellos que se encuentran a frecuencia intermedia (0,101-0,900) (Chakraborty y col., 1980) con independencia del modelo mutacional que sigan los microsatélites. Luikart y col. (1998) demostraron a través de simulaciones y analizando poblaciones naturales de las que existía constancia de que habían atravesado recientemente un cuello de

botella, que su método gráfico tenía la suficiente sensibilidad como para detectar poblaciones que habían atravesado recientemente un cuello de botella; puesto que el primer síntoma detectable de esta situación consiste en un descenso de las frecuencias de la primera categoría (0,001-0,100) con respecto a una o más de las categorías intermedias (0,101-0,900). Este descenso de las frecuencias bajas se hace evidente antes que los otros síntomas asociados tradicionalmente al cuello de botella, como son el descenso de la heterocigosis, el descenso del número medio de alelos por locus o la disminución de la proporción de loci polimórficos.

En el caso de nuestras poblaciones autóctonas, sólo la Raza Mallorquina muestra un perfil similar al que Luikart y col. (1998) describen como representativo de poblaciones que han sufrido recientemente un cuello de botella, con un salto modal entre las categorías (0,001-0,100) y (0,101-0,200). Esta población es junto con la Jaca Navarra la que posee un valor más bajo de heterocigosis observada (0,70), aunque no demasiado alejado de las demás, por lo que la heterocigosis por si sola no hubiera sido un indicativo muy válido de un episodio reciente de cuello de botella. No obstante, las posibilidades de que esta raza haya atravesado recientemente un cuello de botella son grandes, si tenemos en cuenta su evolución demográfica reciente, con un censo de partida de recuperación de la raza en el año 1980, de 20 yeguas y 7 sementales.

En el caso de la muestra poblacional analizada de la raza Pura Sangre Inglés, aplicando el método descrito por Luikart y col. (1998), también podría considerarse que ha pasado un episodio de cuello de botella (información no incluida en los resultados) puesto que la categoría (0,101-0,200) tiene un valor más alto que la categoría (0,001-0,100) y también es significativo su exceso de heterocigosis observada ( $P < 0,01$ ) calculado por el método de Cornuet y Luikart (1996). Un resultado similar fue el obtenido por Cunningham y col. (2001) quienes detectaron un episodio reciente de cuello de botella en la población de caballos Pura Sangre Inglés analizada con 13 microsatélites (AHT4, AHT5, HMS2, HMS6, HMS7, HTG3, HTG4, HTG6, HTG10, LEX004, LEX007, VIAS-H17 y VHL20) tomando como base la diferencia entre la diversidad alélica y la heterocigosis para su detección reciente. La justificación de los autores a esta situación, un número muy reducido de animales son los que han contribuido como reproductores a las generaciones posteriores, es similar a la que se da para la raza Mallorquina.

### VI.3. Variabilidad genética entre razas

El estudio de los estadísticos  $F$  de Wright, permite cuantificar la diferenciación genética existente entre poblaciones, adjudicando parte de la variabilidad a diferencias entre grupos poblacionales, y el resto a diferencias entre los individuos que componen las poblaciones.

Cuantitativamente, un valor de  $F_{ST}$  en el rango entre 0,05 a 0,15 indica una diferenciación moderada, entre 0,15 a 0,25 una diferenciación grande y mayor de 0,25 una diferenciación muy grande (Wright, 1978). Sin embargo, valores de  $F_{ST}$  del orden de 0,05 no son despreciables (Wright, 1978).

En este trabajo se ha obtenido un valor significativo ( $P < 0,01$ ) de 0,078, lo que indica, según el criterio de Wright, una diferenciación moderada. Si tenemos en cuenta que se trata en muchos casos de razas geográficamente cercanas y que cuentan con un ancestro común, no resulta sorprendente que el valor obtenido no rebase la consideración de diferenciación moderada, pero el hecho de que sea significativo, indica que el flujo genético reciente existente entre ellas no ha sido muy alto, y que la deriva genética ha actuado lo suficiente como para diferenciar a las razas de forma significativa. Por tanto, del total de la variabilidad existente, el 7,8% corresponde a diferencias entre razas, y el resto, el 92,2% corresponde a diferencias entre individuos.

Este valor de  $F_{ST}$ , es consecuencia principalmente de la distancia entre el tronco atlántico y el balear. La distancia genética entre las razas que componen el tronco atlántico es de 0,051, significativa ( $P < 0,01$ ); y entre las dos razas del tronco balear de 0,065, también significativa ( $P < 0,01$ ). Por tanto las razas atlánticas estarían menos diferenciadas entre ellas que las razas baleares. El valor de  $F_{ST}$  calculado entre el tronco atlántico y balear es de 0,081, que es un valor comúnmente observado entre razas que pertenecen a una misma especie.

Los valores de  $F_{ST}$  recogidos en otros trabajos han sido, en el caso de razas de perro españolas de 0,099 (Jordana y col., 1992) y 0,108 (Morera y col., 1999), entre razas bovinas europeas 0,070 (Cañón y col., 2001), valores ligeramente más bajos que los encontrados en razas de cabra suizas, con un valor de 0,170 (Saitbekova y col., 1999) y en razas europeas de conejos, 0,150 (Surrridge y col., 1999).

En cuanto al análisis por microsatélite, todos los marcadores fueron significativos para su estimación de  $F_{ST}$  ( $P < 0,01$ ), pero el valor más alto ha sido el obtenido por HMS6 (0,159), y el más bajo AHT4 (0,041). El marcador HMS6 es junto a HMS2 uno de los dos marcadores que diferencia todas las parejas de poblaciones en el test de diferenciación génica de Fisher, y al contrario AHT4 es uno de los marcadores que menos poblaciones diferencia.

Si tenemos en cuenta que la mayor parte de las diferencias entre estas razas es atribuible a deriva genética, resulta interesante calcular qué cantidad de migrantes soportaría cada raza, sin que por ello se resintieran sus diferencias genéticas. A este respecto, las razas más semejantes, son capaces de aceptar un mayor número de migrantes de poblaciones cercanas, y las más alejadas genéticamente con un número mucho más reducido de migrantes ven comprometidas sus estimas de distancias genéticas.

Los niveles altos de flujo genético se contraponen a la adaptación local, por ejemplo, la fijación de alelos es un fenómeno que está favorecido bajo condiciones locales, pero por otro lado el flujo genético genera nuevos polimorfismos en las poblaciones e incrementa el tamaño efectivo de la población local, puesto que existe cierta habilidad para resistir cambios aleatorios en las combinaciones de diferentes alelos. (Barton & Hewitt, 1985)

El cálculo del valor de  $F_{ST}$  entre pares de poblaciones (Tabla 5.9.), ha demostrado que la raza Pura Sangre Inglés muestra lógicamente los valores más altos (0,100 a 0,157), con respecto al resto de las razas; lo que implica que un número de migrantes que variara entre 1,35 y 2,23, desestabilizaría los valores de distancias genéticas entre las raza Pura Sangre Inglés y cualquiera de las otras implicadas.

Sin embargo entre las razas autóctonas españolas de este estudio, la raza Losina y Mallorquina son las que presentan un valor más alto de  $F_{ST}$ , y podrían aceptar un número de migrantes de 1,83 manteniendo sus diferencias genéticas.

El valor más bajo de  $F_{ST}$  encontrado ha sido el existente entre las razas Caballo de Pura Raza Gallega y Pottoka, siendo el valor de migrantes aceptable de 9,52, sin que esto conlleve un acortamiento de las distancias genéticas existentes entre ambas razas.

Es necesario ser cautos a la hora de interpretar estos valores, y tener en cuenta que la incidencia del número de migrantes no sólo va a depender de la distancia genética existente entre las dos razas, sino que una información demográfica adicional sobre el tamaño efectivo de población, además del número efectivo de reproductores de cada sexo, contribuyen a estimar mejor cual va a ser el impacto real del número de migrantes (Ej. Bouteiller & Perrin, 1999).

#### **VI.4. Distancias genéticas entre razas y su representación gráfica**

Bajo la asunción de equilibrio entre deriva y mutación, el poder de diferentes métodos de estimación de distancias genéticas para la construcción de dendrogramas, es discutida por Takesaki y Nei (1996). En este trabajo se apunta que el coste de la varianza por la linealidad en el tiempo de una distancia, no es una buena estrategia, y que es preferible trabajar con una distancia que aunque no sea lineal en el tiempo, muestre la pendiente suficiente como para diferenciar poblaciones, y que posea pequeñas varianzas, puesto que de este modo obtendremos dendrogramas mucho más correctos y de mayor confianza. Es evidente que la longitud de las ramas de este árbol no será representativa de la divergencia en el tiempo.

Goldstein y Pollock (1997), argumentan que asumir un modelo mutacional correcto es decisivo a la hora de seleccionar una distancia, y por esto distancias como  $D_{SW}$  y  $(\delta\mu)^2$  que consideran que las probabilidades de inserción o delección de las repeticiones de los microsatélites son las mismas, resultan poco eficientes, puesto que la distribución alélica de los microsatélites es un proceso asimétrico (Jin y col., 1996; Zhivotovsky y col., 1996).

Los estimadores de distancias genéticas seleccionados en este trabajo, la distancia de Nei (1983),  $D_a$ , y el estimador  $F_{ST}$ , se han utilizado y justificado en numerosos trabajos como los más adecuados cuando se analizan razas o poblaciones dentro de la misma especie. Takesaki y Nei (1996) apuntan que  $D_a$  (Nei, 1983) y  $D_c$  (Cavalli-Sforza & Edwards, distancia cuerda, 1997) son las mejores distancias a la hora de reconstruir topologías y  $D_s$  (Nei, 1972) y  $(\delta\mu)^2$  (Goldstein y col., 1995b) son más adecuadas a la hora de estimar la longitud de las ramas del árbol, y por tanto los tiempos evolutivos.

En este trabajo las matrices de distancias obtenidas con los estimadores  $D_a$  y  $F_{ST}$  fueron posteriormente analizados por el método UPGMA y el dendrograma obtenido muestra en ambos casos que las razas autóctonas aparecen en una rama y la raza Pura Sangre Inglés en otra. Dentro del primer grupo existe un claro agrupamiento de las razas procedentes del tronco atlántico por un lado y las razas baleares por otro, estando más cerca de la raza PSI las razas baleares que las atlánticas. En el dendrograma generado a partir de la matriz de distancias  $D_a$  (Figura 5.23.), las ramas correspondientes a las razas del tronco atlántico muestran valores de bootstrap para la distancia  $D_a$ , entre 49 y 79, siendo la más robusta la que independiza a la raza Pottoka de las razas Jaca Navarra y Caballo de Pura Raza Gallega, aunque son precisamente estas tres razas las que presentan una alternancia en su agrupamiento en su presentación en cada dendrograma.

Esta configuración del dendrograma no implica consideraciones evolutivas, puesto que hay numerosos factores, como diferentes tamaños efectivos de las razas que integran el análisis, y existencia de procesos migratorios, que impiden deducciones evolutivas seguras de una raza respecto a otra. Sin embargo, el árbol obtenido sí conlleva valoraciones de relaciones entre razas.

Bjornstad y col. (2003), analizan las relaciones genéticas entre caballos de Mongolia y caballos noruegos con un panel de microsatélites que comparte diez de los microsatélites utilizados en este trabajo y la distancia escogida ha sido  $D_a$ . En la matriz de distancias, donde también se ha incluido individuos de las razas Pura Sangre Inglés y Standardbred, se observan valores más altos entre las razas noruegas y Pura Sangre Inglés/Standardbred (0,228 a 0,338) que con los caballos de Mongolia (0,177 a 0,266), los cuales están a niveles similares a los encontrados entre los caballos de Islandia y los caballos noruegos (0,171 a 0,232) de los que se sabe que presumiblemente se separaron hace 1000 años. Este último grupo de valores es muy similar a los encontrados en este trabajo entre las razas autóctonas españolas y la raza Pura Sangre Inglés (0,191 a 0,267).

En el estudio sobre algunas razas autóctonas de asnos de España y Marruecos, Aranguren-Méndez y col. (2001), introducen caballos de la raza Merens como *outgroup*. Los animales han sido analizados con los mismos 12 microsatélites de este trabajo, y los valores de la distancia  $D_a$  calculados varían entre 0,057 y 0,197 para las razas de asnos, que rondan valores parecidos a los encontrados entre las razas



autóctonas de caballos españoles. Los valores de distancia estimados entre las razas de asnos y la de caballos varió entre 0,629 a 0,685.

Dentro de la especie bovina, Maudet y col. (2002), encontraron valores de distancia genética  $D_a$  entre razas autóctonas francesas entre 0,102 a 0,171, que son similares a los encontrados en nuestras razas.

A la vista de estos resultados, parece evidente que una diferencia de valores de  $D_a$  entre razas y especies de 0,3 no parece coincidir con un crecimiento lineal de la distancia genética, puesto que el tiempo de divergencia de las razas, desde el punto de vista evolutivo, es mucho más reducido que el tiempo transcurrido desde la especiación. Estudios sobre las relaciones filogenéticas dentro del género *Equus* basados en marcadores genéticos y de proteínas (Clegg, 1974; Kaminski, 1979; Lowenstein y Ryder, 1985; George y Ryder, 1986; Flint y col., 1990) y el estudio de caracteres morfológicos (Eisenmann, 1976; Bennet, 1980; Harris y Porter, 1980), estiman que la divergencia de los caballos respecto de asnos y cebras se produjo hace aproximadamente 2,4 millones de años.

Por tanto, cuando se pretenden comparar razas que pertenecen a especies diferentes, aunque filogenéticamente próximas, habría que decantarse hacia estimadores de distancias genéticas que presentan una mejor evolución lineal con el tiempo, como puede ser la distancia standard de Nei (1978),  $D_s$ , o la distancia  $(\delta\mu)^2$  (Kalinowski, 2002.), aunque en numerosas ocasiones, estas distancias tampoco llegan a resultados muy precisos. Calabrese y col. (2001) analizan dos estimadores de distancias genéticas:  $D_{SW}$  y  $(\delta\mu)^2$ , para validar un nuevo modelo mutacional de los microsatélites, sobre cuatro tipos de divergencias: a) poblaciones humanas africanas *vs.* no africanas, b) humanos *vs.* Chimpancés, c) *Drosophila melanogaster vs. D. simulans* y d) ovejas *vs.* vacas. En el primer caso, utilizaron los datos aportados por Goldstein y col. (1995) y Rubinsztein y col. (1995), y por medio de la distancias  $(\delta\mu)^2$  y  $D_{SW}$ , respectivamente, llegaron a la misma conclusión respecto al tiempo de divergencia, 156000 años, valor que coincide con estimas previas y con los datos arqueológicos. En el caso b), también basándose en los datos de Rubinsztein y col. (1995), con la distancia  $D_{SW}$  y en los datos conjuntos de Bowcock y col. (1994), Deka y col. (1994) y Garza y col. (1995), con la distancia  $(\delta\mu)^2$ , llegaron a valoraciones de un tercio y un séptimo, respectivamente, del tiempo real de divergencia, que se considera ha sido de cinco a seis millones de años (Goodman y col., 1998; Kumar y

Hedges, 1998). En el caso c), el tiempo estimado de divergencia de las especies consideradas, es de aproximadamente 2,5 millones de años (Hey y Kliman, 1993). Asumiendo datos procedentes de diferentes estudios, con ambas distancias, se llegaron a estimas entre 1/16 y 1/8 del tiempo de divergencia real. Esta tendencia a infraestimar los tiempos de divergencia por parte de estas dos distancias genéticas, es más evidente cuanto más distantes son las poblaciones medidas, y podría estar justificada por una selección en contra de los alelos más largos, aunque no está claro cual es el mecanismo biológico que marca este límite superior. Por tanto, quizá sería más adecuado recurrir a otros marcadores genéticos con patrones de mutación más sencillos, cuando se van a estudiar poblaciones en las que los eventos mutacionales tienen un peso muy grande en la estima de los tiempos de divergencia.

En todos los análisis que se han realizado para cuantificar la variabilidad existente dentro y entre poblaciones, se ha asumido que los animales que las componen son inequívocamente pertenecientes a ellas, y para ello se han utilizado básicamente criterios de asignación a raza basados en la morfología del animal. Con el objetivo de conocer la homogeneidad de cada raza, se ha tratado a los individuos como unidades taxonómicas independientes y anónimos, y gracias al alto nivel de polimorfismo de los microsatélites, se han calculado las distancias genéticas entre ellos. La distancia genética estimada, ha sido la distancia de Bowcock y col. (1994), que mide básicamente la proporción de alelos que comparten los animales.

El resultado de la matriz de distancias de Bowcock analizada con el método UPGMA es el dendrograma que aparece en la Figura 5.25. En él se aprecia una estructura poblacional poco clara, que es más grave en el caso de algunas razas del tronco atlántico. La falta de claridad en la estructura poblacional de los caballos del tronco atlántico semisalvajes puede ser interpretada como consecuencia de un mismo origen para todas las razas, un hipotético tronco cántabro-pirenaico y unas características morfológicas muy similares que han permitido una introgresión recíproca entre poblaciones, aunque no lo bastante intensa como para neutralizar los efectos de la deriva genética debida al aislamiento reproductivo al que han llegado las razas por la especial orografía del terreno donde se localizan. Estas razones, y el hecho de que los Libros Genealógicos de algunas razas no se hayan creado hasta fechas recientes, han facilitado un mayor intercambio genético entre ellas, dando lugar a un árbol con una topología de una baja robustez, que muestra valores

relativamente bajos de bootstrapping para algunas razas. Entre las razas atlánticas, la topología del clado Asturcón es la más robusta (84% de los animales del cluster, dentro de la raza), probablemente por el mayor esfuerzo invertido para preservar esta raza durante las últimas décadas, ya que el Libro Genealógico creado en 1981 es el más antiguo de todas las razas descritas. La raza Losina, que también muestra un claro agrupamiento (80% de los animales agrupados juntos), es un caso especial, ya que hoy existe un solo rebaño en manos de un único criador.

Las razas mediterráneas forman claramente un cluster diferente, probablemente por las mayores distancias geográficas desde las zonas atlánticas y también debido a la influencia genética de la raza Árabe.

Las razas al estar basadas en diferencias morfológicas y encontrarse estrechamente ligadas a restricciones geográficas, se le pueden asignar diferentes nombres a poblaciones estrechamente relacionadas localizadas en diferentes áreas administrativas (ej. Diferentes ciudades o diferentes comunidades autónomas como en España). El aislamiento reproductivo debido a las barreras geográficas o a consideraciones socio-políticas facilita una deriva genética dentro de poblaciones que ocasionará una diferenciación genética de las mismas. Las diferencias morfológicas entre poblaciones, las cuales son con frecuencia insignificantes y una consecuencia de la selección artificial, no son tenidas en cuenta por los análisis con marcadores moleculares.

Otro acercamiento al estudio de la variabilidad genética entre razas, es el realizado por medio del análisis de correspondencia, que nos informa de la contribución de cada una de las razas a la diversidad.

En el análisis que incluye únicamente a las razas autóctonas españolas, se aprecia que para el primer factor, que explica el 32% de la diversidad, la raza Asturcón es la que contribuye más a la diversidad. Para el segundo factor que explica el 23,3% de la diversidad, la raza con más peso es la Jaca Navarra y las dos razas baleares conjuntamente, y en el tercer factor, con un 18,6% de la diversidad, la raza más importante es la raza Losina.

Las razas que tienen más peso en los tres primeros factores del análisis de correspondencia, coinciden con las razas que muestran un mejor agrupamiento en el

dendrograma (Figura 5.25.) construido considerando los individuos como OTUs, a excepción de la raza Jaca Navarra. Tan sólo el factor 2 (Figura 5.29.), es un discriminante geográfico, situando a las razas baleares en un extremo, la raza Jaca Navarra en otro, y aproximadamente en la zona media el resto de las razas.

Con el análisis de diferenciación génica de Fisher (Tabla 5.5.) por pares de poblaciones, las mismas razas que muestran los valores más altos de inercia en los tres primeros factores, son las que en más ocasiones quedaban diferenciadas por locus.

En el análisis llevado a cabo, el microsatélite HMS6 parece tener un papel relevante en la explicación de al menos los dos primeros componentes principales, ya que presenta tres alelos con las contribuciones más altas. El alelo 171, que contribuye al primer factor con un 8,1% y al segundo factor con un 15,5%, está presente de forma notable en las poblaciones de Pottoka, Mallorca y Menorquina, y prácticamente ausente en todas las demás. Sin embargo para que la raza Asturcón sea la que presente una mayor contribución al primer factor, es necesaria la participación del resto de los alelos, especialmente el alelo 22 del HMS2 y el 172 de ASB2, que tienen frecuencias muy notables en Asturcón y prácticamente nulas en el resto de razas.

Los microsatélites HMS2 y HMS6 que contribuyen en gran medida a la diversidad total, son los dos mismos marcadores que en el análisis de diferenciación génica de Fisher (Tabla 5.5.) habían detectado diferencias significativas entre todos los pares de poblaciones.

No obstante, la contribución total a la inercia de los microsatélites está bastante equilibrada, especialmente en el caso del primer factor, con los cuatro primeros microsatélites repartidos, HMS6 (13,7%), HMS2 (11,3), HTG10 (11,1%) y ASB2 (11,1%), de modo que la no inclusión en el análisis de alguno de los marcadores no altera la conformación espacial de las razas, y los ejes discriminan del mismo modo a las poblaciones.

Esta circunstancia demuestra la robustez del análisis de correspondencia, lo que contrasta con unos valores de bootstrap no muy altos encontrados en el dendrograma elaborado a partir de la matriz de distancias genéticas (Figura 5.23.). Este problema no es específico de las razas españolas, sino que es frecuente

encontrarlo en poblaciones que se encuentran próximas geográficamente, y se han obtenido resultados similares en el caso de estudios de poblaciones humanas (Cavalli-Sforza y Piazza, 1993; Bowcock y col., 1994; Underhill y col., 2000) y de razas domésticas: en vacuno (MacHugh y col., 1997), cabras (Saitbekova y col., 1999), pollos (Wimmers y col., 2000) y perros (Koskinen y Bredbacka, 2000). Moazami-Goudarzi y Laloë (2002) sugieren dos explicaciones a este hecho. La primera de ellas propone que el origen de este resultado está justificado por el empleo de un número bajo de marcadores para el análisis, de modo que un incremento de su número conllevaría una disminución del error en la estima de las distancias (Foulley y Hill, 1999) y un incremento de los valores de bootstrap de los dendrogramas (Takezaki y Nei, 1996). En la segunda explicación lo justifican por discrepancias entre las tipologías obtenidas con los marcadores individualmente, lo que queda evidenciado por el elevado número de correlaciones negativas obtenidas entre las matrices de distancias  $F_{ST}$  de cada marcador (Tabla 5.10.). Una aportación más a esta teoría se ilustra por el estudio llevado a cabo por Laval y col. (2000), quienes encontraban filogenias más inconsistentes a medida que incrementaban el número de marcadores en su estudio.

La ventaja del Análisis de Correspondencia consiste en que es independiente del modelo mutacional de los marcadores genéticos empleados, y puede ser desarrollado con cualquier tipo de marcador (marcadores fenotípicos, proteínas, grupos sanguíneos, SNPs,...).

### **VI.5. Asignación racial**

De los tres métodos propuestos, el método Bayesiano ha sido el que ha mostrado mayor porcentaje de éxito en la asignación de los individuos de este estudio a su población de origen, con un 86,9% de éxito medio.

En el análisis por raza, la raza Pura Sangre Inglés, es la que presenta mayor porcentaje de éxito, con un 0% en los dos tipos de error estimados. En cuanto a las razas autóctonas y considerando tan solo los resultados obtenidos con el método Bayesiano, la raza Losina coincide en presentar los porcentajes de error más bajos. Esta coincidencia de jerarquización de los dos tipos de error en una sola raza no ha sido la tónica habitual, y resulta curiosa la situación presentada por la raza Mallorquina, con un 20% de error tipo I, y tan solo un 4,2% de error tipo II. En el

caso de la Jaca Navarra, la situación se invierte, y el error tipo I pasa a ser notablemente menor que el error tipo II, con un 10,7% y 19,7% respectivamente.

En líneas generales los resultados obtenidos por este procedimiento muestran cierta analogía con los resultados obtenidos tanto con el análisis de correspondencia como con el dendrograma elaborado con la matriz de distancias de Bowcock (Figura 5.25.) y con el test de diferenciación génica de Fisher por pares de poblaciones. Las razas Asturcón, Losina, Mallorquina y Menorquina, son las razas más diferenciadas del resto y también las que menos porcentaje de error muestran en la asignación racial, al margen de la raza Pura Sangre Inglés.

En cuanto a la eficiencia de asignación por parte de los microsatélites, se repiten los resultados obtenidos con el análisis de correspondencia, ya que los microsatélites HMS6, HTG10 y ASB2 son los marcadores con mayor porcentaje de éxito individual en la asignación.

Existe una correlación positiva entre el número de loci analizados y las posibilidades de asignación con éxito (Blott y col., 1999; Bjornstad y Roed, 2001); sin embargo, esto no justifica un incremento de más de 10 a 20 loci para alcanzar porcentajes de éxito próximos al 99%, puesto que superado el 95%, el incremento en la ganancia por marcador añadido es muy pequeño, y los costes de genotipado no compensan este mayor poder de asignación.

Un resultado interesante es el hecho de que la combinación de los microsatélites que posibilitan mayores porcentajes de asignación individual correcta, no conlleva un mayor éxito de asignación conjunta, sino que combinando de forma específica los microsatélites obtenemos paneles de marcadores con más o menos éxito en la asignación. Este es el caso de los valores acumulados de HTG10, HMS6, ASB2, HTG6, y HMS2 que proporcionan un valor de 71,72% de eficacia en la asignación, pero si se sustituye HMS2 por AHT4, que tiene un menor valor individual, se eleva a 72,64%. Una posible explicación podría ser la presencia de individuos genéticamente atípicos en las razas para determinados marcadores, por lo que los paneles óptimos de microsatélites para diferenciar razas, son distintos en función de las razas comparadas o por el hecho de que algunos microsatélites muestran diferentes topologías en la diferenciación de poblaciones, como se deduce de las correlaciones negativas obtenidas al comparar las matrices de distancias  $F_{ST}$

entre pares de poblaciones, para cada uno de los marcadores estudiados (Tabla 5.10.).

Los resultados del análisis por parejas han demostrado que existe una correlación positiva entre los valores de  $F_{ST}$  y el porcentaje de éxito de asignación racial, de modo que cuanto más alto sea el valor de  $F_{ST}$  estimado entre una pareja de razas, mayor poder de asignación va a existir. Estos resultados corroboran los obtenidos por Bjornstad y Roed (2001) y contradicen los de Blott y col. (1999), quienes llegaron a la conclusión de que la correlación positiva existía con mayores heterocigosis de los marcadores y un mayor número de alelos medio, y no existía con los valores de  $F_{ST}$ . En la Tabla 6.3. aparecen comparados los 4 parámetros estimados en este trabajo sobre el total de razas estudiadas.

En el análisis por parejas, el microsatélite con mayor porcentaje de éxito ha sido HMS6 en 11 de las 20 combinaciones, con valores entre el 83,24% y el 95,35%. Este último caso es el de las razas Losina y Mallorquina, lo que demuestra el alto poder de discriminación de este marcador en estas dos razas. El microsatélite con menor porcentaje de éxito ha sido HTG8 en 6 ocasiones, aunque el valor más bajo de todas las combinaciones, ha sido el aportado por el microsatélite HTG6, con un 33,01%, en el caso de la pareja de razas Caballo de Pura Raza Gallega y Menorquina.

Aunque existen microsatélites que son más potentes en su poder de asignación, resulta poco práctico a priori seleccionar microsatélites basados en sus valores de  $F_{ST}$  sobre el total de las razas, y mucho menos sobre las heterocigosis y número de alelos medio, como propone Blott y col. (1999), sino que parece más conveniente en función de las razas que intervengan seleccionar unos microsatélites u otros. Por ejemplo, en el caso de las razas Losina y Mallorquina, tan solo con tres microsatélites es posible alcanzar el 100% de asignación correcta, HMS6, VHL20 y AHT4, que son en el ranking individual de asignación sobre todas las razas, el primero, cuarto y quinto; mientras que en el caso de las razas Jaca Navarra y Caballo de Pura Raza Gallega es necesaria la participación de todos los microsatélites para alcanzar un valor final del 89,18%.

**Tabla 6.3.:** Valores por microsatélite del porcentaje de éxito de asignación racial, el número de alelos total observado, la heterocigosis esperada y el estadístico  $F_{ST}$ .

	% asignación	Alelos	He	$F_{ST}$
HTG4	27,17	7	0,71	0,060
HTG6	35,49	10	0,64	0,108
HTG7	30,31	6	0,70	0,082
HTG8	32,53	9	0,75	0,079
HTG10	39,93	11	0,84	0,081
HMS2	34,38	12	0,83	0,080
HMS3	30,68	10	0,76	0,112
HMS6	38,82	8	0,78	0,153
HMS7	30,68	9	0,81	0,056
ASB2	37,15	11	0,83	0,058
AHT4	34,01	9	0,80	0,042
AHT5	19,96	8	0,85	0,041
VHL20	32,53	10	0,85	0,061

## VI. 6. Implicaciones para la conservación de la diversidad genética.

Dentro de los programas de conservación de los recursos genéticos un aspecto crucial consiste en la estimación lo más fiable posible de las probabilidades de extinción de una raza, y para ello es necesario tener en cuenta no sólo parámetros genéticos, sino que los factores ambientales, sociales y políticos, también son muy informativos.

La diversidad genética es una de las tres formas de biodiversidad reconocidas por la Unión de Conservación Mundial (IUCN) que merecen ser conservadas. La necesidad de conservar la diversidad genética de las poblaciones se basa en dos argumentos: la necesidad de diversidad genética para que ocurra la evolución, y la relación esperada entre la diversidad genética y la adaptabilidad de la población. Debido a que la pérdida de diversidad genética se relaciona con la endogamia, y la endogamia reduce la aptitud reproductiva, se espera una correlación entre diversidad genética y adaptabilidad de la población. Tradicionalmente se consideran como medidas de diversidad genética, la heterocigosis (Lewontin, 1974), el número



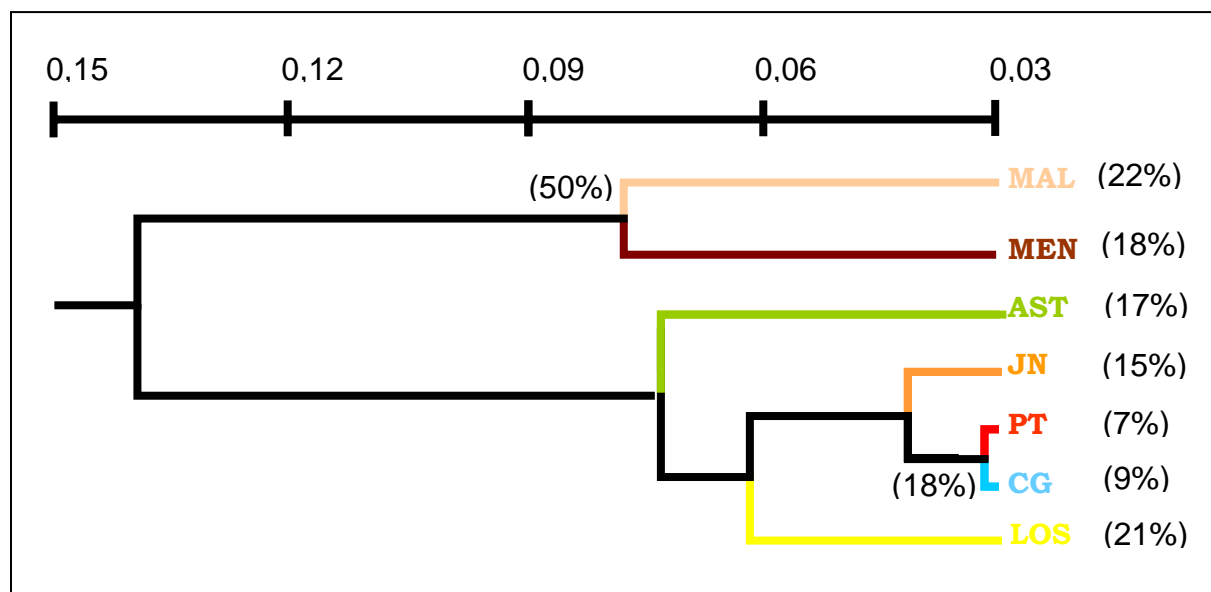
de loci polimórficos, el número de alelos por locus, y el contenido de información polimórfica (Botstein y col., 1980).

Con el objetivo de resolver problemas de conservación genética los microsatélites se han estudiado sobre especies tan diversas como los chimpancés, las tortugas marinas, los cánidos salvajes y osos polares (Morin y col., 1994; FitzSimmons y col., 1995; Gottelli y col., 1994; Paetkau y col., 1995) y con más éxito que otros marcadores, ya que han demostrado una mayor sensibilidad para detectar variación genética en algunas especies en las que no se había detectado variabilidad al ser analizadas con otro tipo de marcadores (Hughes y Queller, 1993; Menotti-Raymond y O'Brien, 1995).

García y col. (2000), comparan dos procedimientos de estimación de la diversidad genética para el grupo de poblaciones incluidas en este estudio. El primero de ellos se basa en un procedimiento diseñado por Weitzman (1992, 1993), quien desarrolla una medida de diversidad a partir de distancias genéticas que poseen una serie de propiedades empíricas. El segundo método corresponde al análisis de correspondencia.

Los resultados obtenidos por García y col., (2000) con respecto al procedimiento de Weitzman aparecen representados gráficamente en el dendrograma de la Figura 6.1., donde las cifras que aparecen entre paréntesis representan el porcentaje de diversidad que se pierde por la desaparición de esa raza, o del cluster.

Desde la perspectiva de pérdida de la diversidad la situación más grave vendría dada por la desaparición de las razas Mallorquina y Menorquina, las cuales acumulan entre las dos un 50% de la diversidad total. La raza Mallorquina con un 22% de la diversidad posee un valor más alto que las razas Pottoka y Caballo de Pura Raza Gallega juntos, con un 18%. La pérdida de variabilidad genética de un conjunto de razas no resulta de la suma de la variabilidad genética individual de cada raza, ya que éstas no son independientes.



**Figura 6.1.:** Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA partir de la matriz de distancias genéticas  $F_{ST}$ . Las cifras entre paréntesis al lado de cada raza representa el porcentaje de diversidad que se pierde por la desaparición de esa población. Las cifras en los nodos representan el porcentaje de pérdida de diversidad por la desaparición de esos clusters por el procedimiento de Weitzman.

Los resultados obtenidos por el análisis de correspondencia muestran unos valores de inercia para cada raza que junto a los valores de diversidad obtenidos por el procedimiento de Weitzman (Tabla 6.4.) dan una correlación de 0,6. Las razas que poseen inercias más altas, son la raza Asturcón en el primer eje con un 64,5%, la raza Losina en el segundo eje con un 46,6% y la raza Jaca Navarra en el tercer eje con un 74,4%.

**Tabla 6.4.:** Valores de inercias (análisis de correspondencia) y diversidad (procedimiento de Weitzman) aportadas por cada una de las razas analizadas presentadas en el trabajo de García y col. (2000).

	AST	JN	LOS	CG	PT	MAL	MEN
INERCIA	22	17	16	10	8	13	15
WEITZMAN	17	15	21	7	9	22	17

Como se puede ver, los resultados obtenidos por cada método son diferentes, y los valores de diversidad genética que aporta cada una de las razas son distintos.

Este hecho puede estar justificado porque el primer procedimiento está basado en distancias genéticas, que dan lugar a topologías muy diferentes, dependiendo del modelo mutacional de los microsatélites en el que están basadas y por tanto su credibilidad va a estar muy condicionada al acierto en la elección de la distancia genética apropiada, mientras que con el segundo método existe una independencia absoluta de modelos mutacionales, y los resultados se basan exclusivamente en alelos y frecuencias alélicas. En 1998 Thaom d'Arnolid y col. hacen críticas al procedimiento de Weitzman, como la de no tener en cuenta la variabilidad dentro de poblaciones, que si es tomada en cuenta por el análisis de correspondencia.

En el caso de las especies domésticas se ha asimilado el término de homocigosis al de extinción, en cuyo caso la raza Losina posee el valor de homocigosis más alto y por tanto las mayores probabilidades de extinción. En el estudio desarrollado por Reed y Frankham (2003), se estimó una correlación media ponderada entre medidas de diversidad genética, entre ellas el valor de la heterocigosis, y medidas de adaptabilidad de la población de 0,43, que fue altamente significativa y justificaba el 19% de la variación de la adaptabilidad.

Por tanto, a pesar de que estudios como el análisis de correspondencia aportan una información objetiva e importante acerca de la pérdida de variabilidad genética como consecuencia de la desaparición de alguna de estas razas, ante situaciones graves de peligro de extinción, en las que los recursos económicos son limitados, es necesario priorizar unas razas sobre otras, y para ello es importante contar con información adicional sobre la situación global de cada una de ellas: tamaño total de la población, cambio de tamaño de la población en los últimos diez años, distribución geográfica de la raza, riesgo de cruzamiento indiscriminado, nivel de organización entre los criadores, existencia o no de planes de conservación, situación política de las zonas de asentamiento de estas razas, importancia socio-cultural de las razas, nivel de información y veracidad de la misma de cada raza, etc...

## **VII. CONCLUSIONES**

## VII. CONCLUSIONES.

- 1.- Los microsatélites han demostrado una vez más ser una herramienta útil para evidenciar las diferencias genéticas existentes en este caso, entre las razas autóctonas españolas que participan en este estudio.
- 2.- La variabilidad genética encontrada en las razas autóctonas, que cuentan con censos muy reducidos, es superior a la de la raza Pura Sangre Inglés, principalmente como consecuencia de presiones selectivas menos intensas.
- 3.- Las razas del tronco atlántico, están más próximas genéticamente, como consecuencia de un posible origen común en los caballos celtas.
- 4.- Caballo de Pura Raza Gallega y Pottoka, son las dos razas con las composiciones individuales más heterogéneas.
- 5.- Las razas con mayor aportación a la diversidad genética total son Asturcón, Jaca Navarra y Losina.
- 6.- Los mejores resultados en la asignación o exclusión de individuos a razas están correlacionados positivamente con valores más altos de  $F_{ST}$  entre razas.
- 7.- La mejor combinación de microsatélites para asignar individuos anónimos a razas es distinta en función de las razas implicadas, por lo que parece más conveniente su selección en función de las razas que intervengan que a partir de estimadores totales como la heterocigosis o el número de alelos.
- 8.- El microsatélite HMS3 es sospechoso de presentar alelos nulos en estas razas y debería descartarse en este tipo de análisis.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

- 
- **Achmann R, Huber T, Wallner B, Dovc P, Muller M, Brem G** (2001). Base substitutions in the sequences flanking microsatellite markers HMS3 and ASB2 interfere with parentage testing in the Lipizzan horse. *Animal Genetics* 32(1):52.
  - **Alderson L** (1974). Genetic conservation and breed improvement. *The Ark*, 1:98.
  - **Allendorf FW** (1986). Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biology* 5:181-190.
  - **Amos W, Sawcer SJ, Feakes RW, Rubinsztein DC** (1996). Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. *Nature Genetics* 13(4):390-1.
  - **Andreasson H, Asp A, Alderborn A, Gyllensten U, Allen M** (2002). Mitochondrial sequence analysis for forensic identification using pyrosequencing technology. *Biotechniques* 32(1):124-6, 128, 130-3.
  - **Andreasson H, Gyllensten U, Allen M** (2002). Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. *Biotechniques* 33(2):402-4, 407-11.
  - **Anthony DW, Brown DR** (1991). The origins of horseback riding. *Antiquity* 246: 22-38.
  - **Aparicio Sánchez G** (1956). Exterior de los grandes animales domésticos. Morfología externa e identificación individual. Imp. Moderna. Córdoba.
  - **Aparicio G** (1960). Zootecnia Especial. Imprenta Moderna. Córdoba. pp 5-27; 451-467.
  - **Aquilina G, Bignami M** (2001). Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage. *Journal of Cell Physiology* 187, 145-154.
  - **Aranguren-Méndez J, Jordana J, Gomez M** (2001). Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetics Selection and Evolution* 33, 433-442.
  - **Ashley CT Jr, Warren ST.** (1995). Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annual Review of Genetics* 29:703-28.
  - **Atkin NB** (2001). Microsatellite instability. *Cytogenetics and Cell Genetics* 92, 343-346.
  - **Aurich C, Achmann R, Aurich JE** (2003). Semen parameters and level of microsatellite heterozygosity in Noriker draught horse stallions. *Theriogenology* 60, 371-378.

- **Avise JC, Nelson WS, Sibley CG** (1994). Why one-kilobase sequences from mitochondrial DNA fail to solve the Hoatzin phylogenetic enigma. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 3(2):175-84.
- **Ayala FJ, Escalante A, O'Huigin C, Klein J** (1994). Molecular genetics of speciation and human origins. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 91: 6787-6794.
- **Bachtrog D, Weiss S, Zangerl B, Brem G, Schlötterer C** (1999). Distribution of dinucleotide microsatellites in the *Drosophila melanogaster* genome. *Molecular Biology and Evolution* 16:602-610.
- **Bailey E, Reid RC, Skow LC, Mathiason K, Lear TL, McGuire TC** (1997). Linkage of the gene for equine combined immunodeficiency disease to microsatellite markers HTG8 and HTG4; syntenic and FISH mapping to ECA9. *Animal Genetics* 28(4):268-73.
- **Barton NH y Hewitt GM** (1985). Analysis of Irby zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16,113-148.
- **Bassam BJ, Caetano-Anollés G y Gresshoff PM** (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Analytical Biochemistry* 80, 81-84.
- **Belkhir k, Borsa P, Goudet J, Chikhi L y Bonhomme F** (1998). GENETIX, logiciel sous Windows<sup>TM</sup> pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- **Bennet DK** (1980). Stripes do not a zebra make, Part 1: A cladistic analysis of Equus. *Systematics Zoology* 29:272-287.
- **Benzécri J P** (1973). L'Analyse des Données: T. 2, I' Analyse des correspondances. Paris: Dunod.
- **Bibikova VI** (1986). A study of the earliest domestic horses of Eastern Europe. In Telegrin DY (Ed), *Dereivka settlement and cemetery of Copper Age horse keepers on the Middle Dnieper*. BAR International Series 287.
- **Biet E, Sun J, Dutreix M** (1999). Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect on ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Research* 27, 596-600.



- 
- **Binns MM, Holmes NG, Holliman A y Scott AM** (1995). The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. *British Veterinary Journal* 151, 9-15.
  - **Bjornstad G, Nilsen NO, Roed KH** (2003). Genetic relationship between Mongolian and Norwegian horses?. *Animal Genetics* 34(1):55-8.
  - **Bjornstad G, Roed KH** (2001). Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers. *Animal Genetics* 32:59-69.
  - **Bjornstad G, Roed KH** (2002). Evaluation of factors affecting individual assignment precision using microsatellite data from horse breeds and simulated breed crosses. *Animal Genetics* 33(4):264-70.
  - **Blott SC, Williams JL, Haley CS** (1999). Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity* 82, 6, 613-619.
  - **Bökönyi S** (1978). The earliest waves of domestic horses in East Europe. *J Indo-Europ Stud* (1-2): 17-73.
  - **Bosch E, Calafell F, Perez-Lezaun A, Comas D, Mateu E, Bertranpetit J** (1997). Population history of north Africa: evidence from classical genetic markers. *Human Biology* 69(3):295-311.
  - **Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW** (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32(3):314-31.
  - **Bouteiller C, Perrin N** (1999). Individual reproductive success and effective population size in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267, 701-705.
  - **Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL** (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 31;368(6470):455-7.
  - **Bowling AT, del Valle A y Bowling M** (1998). Verification of horse maternal lineage based on derived mitochondrial DNA sequence. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 115, 351-356.

- **Brakefield PM y Saccher IJ** (1994). Guidelines in conservation genetics and their use of the population cage experiments with butterflies to investigate the effects of genetic drift and inbreeding. In: *Conservation Genetics* (Loeschcke V, Tomiuk J and Jain SK, eds.) Berlin: Birkhauser, 165-179.
- **Branicki W, Kupiec T, Pawlowski R** (2003). Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *Journal of Forensic Science* 48(1):83-7.
- **Breen M, Lindgren G, Binns MM, Norman J, Irvin Z, Bell K, Sandberg K, Ellegren H** (1997). Genetical and physical assignments of equine microsatellites—first integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mammalian Genome* 8(4):267-73.
- **Brockhurst V, Barnard R, Wolter L, Giffard P, Timms** (2001). Development of ligase-assisted spacer addition for the measurement of microsatellites. *Biotechniques* 31 (1):96-106.
- **Brown D, Anthony D** (1998). Bit wear horseback riding and the Botai site in Kazakstan. *Journal of Archaeological Science* 25: 331-347.
- **Bruford MW, Wayne RK** (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development* 3(6):939-43.
- **Calabrese PP, Durrett RT, and Aquadro CF** (2001). Dynamics of Microsatellite Divergence Under Stepwise Mutation and Proportional Slippage/Point Mutation *Models Genetics* Vol. 159, 839-852.
- **Cañón J, Alexandrino P, Bessa I, Carleos C, Carretero Y, Dunner S, Ferran N, Garcia D, Jordana J, Laloe D, Pereira A, Sanchez A, Moazami-Goudarzi** (2001). Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genetics Selection and Evolution* 33(3):311-32.
- **Carrano AV, Lamerdin J, Ashworth LK, Watkins B, Branscomb E, Slezak T, Raff M, de Jong PJ, Keith D, McBride L, et al.** (1989). A high-resolution, fluorescence-based, semiautomated method for DNA fingerprinting. *Genomics* 4(2):129-36.
- **Cataste P, Chen X, Mariappan SV, Bradbury EM, Gupta G** (1999). DNA repeats in the human genome. *Genetica* 106, 15-36.
- **Cavalli-Sforza LL, Manozzi P, Piazza A** (1994). The History and Geography of Human Genes. Princeton University Press.

- 
- **Cavalli-Sforza LL** (2000). Genes, Pueblos y Lenguas. Ed. Crítica. Barcelona.
  - **Cavalli-Sforza LL, Piazza A** (1993). Human genomic diversity in Europe: a summary of recent research and prospects for the future. *European Journal of Human Genetics* 1(1):3-18.
  - **Cavalli-Sforza LL y Edwards AWF** (1967). Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19:233-257.
  - **Chakraborty R, Jin L** (1993). A unified approach to study hypervariable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances. *EXS* 67:153-75
  - **Chakraborty R, Fuerst PA, Nei M** (1980). Statistical studies on protein polymorphism in natural populations. III. Distribution of allele frequencies and the number of alleles per locus. *Genetics* 94: 1039-1063.
  - **Chambers GK, MacAvoy ES** (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology* B126, 455-476.
  - **Chen W, Jinks-Robertson S** (1998). Identification of a functional CT-element in the *Phytophthora infestans* *piypt1* gene promoter. *Gene* 198, 159-164.
  - **Chowdhary BP, Raudsepp T, Honeycutt D, Owens EK, Piumi F, Guerin G, Matise TC, Kata SR, Womack JE, Skow LC** (2002). Construction of a 5000 (rad) whole-genome radiation hybrid panel in the horse and generation of a comprehensive and comparative map for ECA11. *Mammalian Genome* 13(2):89-94.
  - **Chowdhary BP, Raudsepp T, Kata SR, Goh G, Millon LV, Allan V, Piumi F, Guerin G, Swinburne J, Binns M, Lear TL, Mickelson J, Murray J, Antczak DF, Womack JE, Skow LC** (2003). The first-generation whole-genome radiation hybrid map in the horse identifies conserved segments in human and mouse genomes. *Genome Research* 13(4):742-51.
  - **Clegg JB** (1974). Horse haemoglobin polymorphism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 241:61-69.
  - **Codegoni AM, Bertoni F, Colella G, Caspani G, Grassi L, D'Incalci M, Brogginini M** (1999). Microsatellite instability and frameshift mutations in genes involved in cell cycle progression or apoptosis in ovarian cancer. *Oncology Research* 11, 297-301.

- **Collins DW, Jukes TH** (1994). Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. *Genomics* 20(3):386-96.
- **Cornuet JM y Luikart G** (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
- **Cornuet JM, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M** (1999). New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153(4):1989-2000.
- **Cornuet JM, Aulagnier S, Lek S, Franck S, Solignac M** (1996). Classifying individuals among infra-specific taxa using microsatellite data and neural networks. *C R Acad Sci III* 319(12):1167-77.
- **Crow JF, Kimura M** (1970). An Introduction to Population genetics Theory (EDS Harper, Row), p. 591. New York, USA.
- **Csink AK, Henikoff S** (1998). Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends in Genetics* 14, 200-204.
- **Cuadrado A, Schwarzacher T** (1998). The chromosomal organization of simple sequence repeats in wheat and rye genomes. *Chromosoma* 107, 587-594.
- **Cunningham EP, Dooley JJ, Splan RK, Bradley DG** (2001). Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to thoroughbred horses. *Animal Genetics* 32,360-364.
- **Cymbron T, Loftus RT, Malheiro MI, Bradley DG** (1999). Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Portuguese cattle. *Proceedings of the Royal Society of London. Serie B: Biological Sciences*. 22;266(1419):597-603.
- **Davies N, Villablanca FX, Roderick GK** (1999). Determining the source of individuals: multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 14(1):17-21.
- **Deka R, Shriver MD, Yu LM, Jin L, Aston CE, Chakraborty R, Ferrell RE** (1994). Conservation of human chromosome 13 polymorphic microsatellite (CA)<sub>n</sub> repeats in chimpanzees. *Genomics* 22:226-230.

- 
- **Denis B** (1982). A propos de la notion de race: points de vue d'un zootechnicien. *Ethnozootechnie*, 29:61-69.
  - **Denniston C** (1978). Small population size and genetic diversity: Implications for endangered species. Temple, S. A. *Endangered Birds: Management Techniques for Preserving Threatened Species*. Madison, WI: University of Wisconsin Press; pp. 281-289.
  - **Dent AA y Goodall DM** (1962). *A History of British Native Ponies*. London: J.A. Allen, 1988.
  - **Di Rienzo , Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NM** (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA* 91, 3166-3170.
  - **Donis-Keller H, Green P, Helms C, Cartinhour S, Weiffenbach B, Stephens K, Keith TP, Bowden DW, Smith DR, Lander ES, Botstein D, Akots G, Rediker KS, Gravius T, Brown V, Rising M, Parker C, Powers JA, Watt DE, RKE, Bricker A, Phipps P, Muller-Kahle H, Fulton TR, Ng S, Schumm JW, Braman JC, Knowlton RG, Barker DF, Crooks SM, Lincoln SE, Dalu MJ, Abrahamson J** (1987). A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 23;51(2):319-37.
  - **Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT** (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics* 49(4):746-56.
  - **Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R** (1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12(2):241-53.
  - **Eichler EE** (1999). Repetitive conundrums of centromere structure and function. *Human Molecular Genetics* 8, 151-155.
  - **Eisenmann V** (1976). Euidae from the Shungura formation. In: Coppens Y, Howell TC, Isaac GL, Leakey REF (eds) *Earliest man and environments in the Lake Rudolf Basin*. University of Chicago Press, Chicago, London, pp225-233.
  - **Ellegren H** (2000). Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nature Genetics* 24,400-402.

- **Ellegren H., Johansson M., Sandberg K y Andersson L** (1992). Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Animal Genetics* 23, 133-42.
- **Emile JF, Lemoine A, Bienfait N, Terrier P, Azoulay D, Debuire B** (2002). Length analysis of polymerase chain reaction products: a sensitive and reliable technique for the detection of mutations in KIT exon 11 in gastrointestinal stromal tumors. *Diagnostic Molecular Pathology* 11(2):107-12.
- **Escofier B y Pagès J** (1990). Analyses factorielles simples et multiples. Paris: Dunod.
- **Estoup A, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM** (1995). Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics* 140(2):679-95.
- **Estoup A, Jarne P, Cornuet JM** (2002). Homoplasy and mutational model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Molecular Ecology* 11,1591-1604.
- **Estoup A, Tailliez C, Cornuet JM, Solignac M** (1995). Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution* 12(6):1074-84.
- **Falconer DS y Mackay TFC** (1996). Introduction into quantitative genetics. Longman house, Harlow, Essex, 464 p.
- **Favre L, Balloux F, Goudet J, Perrin N** (1997). Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocodylus russula*: evidence from field data and microsatellite patterns. *Proceedings of the Royal Society of London. Serie B: Biological Sciences*. 22;264(1378):127-32.
- **Felsenstein J** (1982). How can we infer geography and history from gene frequencies?. *Journal of Theoretical Biology* 96:9-20.
- **FitzSimmons NN, Moritz C, Moore SS** (1995). Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* 12(3): 432-40.
- **Flint J, Ryder OA y Clegg JB** (1990). Comparison of the  $\alpha$ -globin gene cluster structure in Perissodactyla. *Journal of Molecular Evolution* 30:36-42.

- 
- **Forbes SH, Hogg JT, Buchanan FC, Crawford AM, Allendorf FW** (1995). Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep. *Molecular Biology and Evolution* 12(6):1106-13
  - **Foulley JL y Hill WG** (1999). On the precision of estimation of genetic distance. *Genetics Selection and Evolution* 31:457-464.
  - **Frankel OH y Soule ME** (1981). Conservation and evolution. Cambridge: Cambridge University Press.
  - **Frankham R** (1995). Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* 29:305-327.
  - **Fredholm M, Wintero AK** (1995). Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. *Mammalian Genome* 6(1): 11-8.
  - **Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG, Jr Warren ST, Oostra BA, Nelson DL y Caskey CT** (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67(6):1047-58
  - **García D, Checa ML, García-Atance P, Dunner S, Cañón J** (2000). Medidas de diversidad genética en poblaciones de caballos celtas españoles. *X Reunión Nacional de Mejora Genética Animal*, Caldas de Munbuí, 8-9 de Junio de 2000.
  - **Garza JC, Slatkin M, and Freimer NB** (1995). Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Molecular Biology and Evolution* 12:594-603
  - **George M y Ryder OA** (1986). Mitochondrial DNA evolution I the genus *Equus*. *Molecular Biology and Evolution* 3:535-546.
  - **Georges M, Lequarre AS, casteli M, Hanset R, Vassart G** (1988). DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 47, 127-131.
  - **Geysen D, Delespaulx V, Geerts S** (2003). PCR-RFLP using *Ssu-rDNA* amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Veterinary Parasitology* 2;110(3-4):171-80.
  - **Gilbert W y Maxam A** (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, pp. 560-564, 1977.

- **Gimbutas M** (1991). The Civilization of the Goddess: Harper, SanFrancisco.
- **Godard S, Vaiman A, Schibler L, Mariat D, Vaiman D, Cribiu EP, Guerin G** (2000). Cytogenetic localization of 44 new coding sequences in the horse. *Mammalian Genome* 11(12):1093-7
- **a Goldstein DB, Ruiz Linares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW** (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139(1):463-71
- **b Goldstein DB, Ruiz Linares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW** (1995). Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 18;92(15):6723-7
- **Goldstein DB, Pollock DD** (1997). Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity* 88, 335-342.
- **González-Pizarro J de D** (1903). Elementos de Zootecnia General. I. Tomo. Tip. Herederos Angel González. León.
- **Goodman M, Porter CA, Czelusniak J, Page SL, Schneider H, Shoshani J, Gunnell G, Groves CP** (1998). Toward a phylogenetic classification of primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9:585-598
- **Gottelli D, Sillero-Zubiri C, Applebaum GD, Roy MS, Girman DJ, Garcia-Moreno J, Ostrander EA, Wayne RK** (1994). Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Molecular Ecology* 3(4): 301-12.
- **Goudet J** (1995). FSTAT, version 1.2, a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86, 485-486.
- **Grosclaude F, Aupetit RY, Lefebvre J y Meriaux JC** (1990). Essai d'analyse des relations génétiques ebtre les races bovines francaises à l'aide du polymorphisme biochimique. *Genetics Selection and Evolution* 22:317-338.
- **Guerin G, Bailey E, Bernoco D, Anderson I, Antczak DF, Bell K, Binns MM, Bowling AT, Brandon R, Cholewinski G, Cothran EG, Ellegren H, Forster M, Godard S, Horin P, Ketchum M, Lindgren G, McPartlan H, Meriaux JC, Mickelson JR, Millon LV, Murray J, Neau A, Roed K, Ziegle J, y col.** (1999). Report of the International Equine Gene Mapping Workshop: male linkage map. *Animal Genetics* 30(5):341-54.



- 
- **Guérin G, Bertaud M y Amigues Y** (1994). Characterization of seven new horse microsatellites: HMS15 and HMS20. *Animal Genetics* 25, 62.
  - **Guo SW, Thompson EA** (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48(2):361-72.
  - **Haig SM, Gratto-Trevor CL, Mullins TD, Colwell MA** (1997). Population identification of western hemisphere shorebirds throughout the annual cycle. *Molecular Ecology* 6, 413-27.
  - **Hanotte O, Tawah CL, Bradley DG, Okomo M, Verjee Y, Ochieng J, Rege JE** (2000). Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos taurus* and an indicine *Bos indicus* Y specific allele amongst sub-saharan African cattle breeds. *Molecular Ecology* 9(4):387-96
  - **Hanslik S, Harr B, Brem G, Schlötterer C** (2000). Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary New World and Old World Holstein Friesian populations. *Animal Genetics* 31,31-38.
  - **Harris AH, Porter LS** (1980). Late Pleistocene horses of Dry cave, Eddy County, New Mexico. *Journal of Mammalogy* 61:46-65.
  - **Hedrick PW** (1995). Gene flow and genetic restoration: the Florida panther as a case study. *Conservation Biology* 5:996-1007.
  - **Hedrick PW y Miller PS** (1992). Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecological Applications* 2:30-46.
  - **Hentschel CC** (1982). Homocopolymer sequences in the spacer of a sea hurchin histone gene repeat are sensitive to S1 nuclease. *Nature* 295:714-716.
  - **Hey J and Kliman RM** (1993). Population genetics and phylogenetics of DNA sequence variation at multiple loci within the *Drosophila melanogaster* species complex. *Molecular Biology and Evolution* 10:804-822
  - **Hirota K, Piumi F, Sato F, Ishida N, Guerin G, Miura N, Hasegawa T** (2001). FISH assignment of two equine BAC clones containing SRY and ZFY. *Animal Genetics*; 32(5):326-7.

- **Hoffman EK, Trusko SP, Murphy M, George DL** (1990). An S1 nuclease-sensitive homopurine/homopyrimidine domain in the c-k-ras promoter interacts with a nuclear factor. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 87, 2705-2709.
- **Huang JX, Mehrens D, Wiese R, Lee S, Tam SW, Daniel S, Gilmore J, Shi M, Lashkari D** (2001). High-throughput genomic and proteomic analysis using microarray technology. *Clin Chem* 47(10):1912-6
- **Hughes CR, Queller DC** (1993). Detection of highly polymorphic microsatellite loci in species with little allozyme polymorphism. *Molecular Ecology* 2(3): 131-7.
- **Hurles ME, Nicholson J, Bosch E, Renfrew C, Sykes BC, Jobling MA** (2002). Y chromosomal evidence for the origins of oceanic-speaking peoples. *Genetics* 160(1):289-303.
- **Hurst LD y Ellegren H** (1998). Sex biases in the mutation rate. *Trends Genet* 14, 446-452.
- **Hussein MR, Wood GS** (2002). Building bridges in cancer: mismatch repair and microsatellite instability. *American Journal of Dermopathology*, 24, 76-81.
- **Ishida N, Hasegawa T, Takeda K, Sakagami M, Onishi A, Inumaru S, Komatsu M, Mukoyama H** (1994a). Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Animal Genetics* 25, 215-221.
- **Ishida N, Hirano T y Mukoyama H** (1994b). Detection of aberrant alleles in the D-loop region of equine mitochondrial DNA by single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. *Animal Genetics* 25, 287.
- **Jankowski C, Nasar F, Nag DK** (2000). Meiotic instability of CAG repeat tracts occurs by doubled-strand break repair in yeast. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 97, 2134-2139.
- **Jansen T, Forster P, Levine MA, Oelke H, Hurles M, Renfrew C, Weber J, Olek K** (2002). Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99(16):10905-10. Epub 2002 Jul 18.
- **Jeffreys A, Wilson V y Thein S** (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316, 76-79.

- **Jeffreys AJ, Murray J, Neumann R** (1998). High-resolution mapping of crossovers in human sperm defines a minisatellite-associated recombination hotspot. *Molecular Cell*, 2, 267-273.
- **Jimenez JA, Hughes DA, Alaks G, Graham G, Lacy RC** (1994). An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat. *Science* 266: 271-273.
- **Jin L, Macaubas C, Hallmayer J, Kimura A, Mignot E** (1996). Mutation rate among alleles at microsatellite loci: phylogenetic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 15285-15288.
- **Jordana J, Piedrafita J, Sanchez A, Puig P** (1992). Comparative F statistics analysis of the genetic structure of ten Spanish dog breeds. *Journal of Heredity* 83(5):367-74.
- **Jorde LB, Rogers AR, Bamshad M, Watkins WS, Krakowiak P, Sung S, Kere J, Harpending HC** (1997). Microsatellite diversity and the demographic history of modern humans. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 94(7):3100-3.
- **Junge A, Steevens M, Madea B** (2002). Successful DNA typing of a urine sample in a doping control case using human mitochondrial DNA analysis. *Journal of Forensic Science* 47(5):1022-4.
- **Kalinowski ST** (2002). Evolutionary and statistical properties of three genetic distances. *Molecular Ecology* 11(8):1263-73.
- **Kaminski M** (1979). The biochemical evolution of the horse. *Comparative Biochemistry and Physiology* 63B:175-178.
- **Karlin S, Campbell AM, Mrázek J** (1998). Comparative DNA analysis across diverse genomes. *Annual review of Genetics*, 32, 185-225.
- **Kelly L, Postiglioni A, De Andres DF, Vega-Pla JL, Gagliardi R, Biagetti R, Franco J** (2002). Genetic characterisation of the Uruguayan Creole horse and analysis of relationships among horse breeds. *Research in Veterinary Science* 72(1):69-73.
- **Khodjet El Khil H, Triki Marrakchi R, Yacoubi Loueslati B, Langaney A, Fellous M, Benammar Elgaaied A** (2001). Y chromosome microsatellite variation in three populations of Jerba Island (Tunisia). *Annals of Human Genetics* 2001 65(Pt 3):263-70.
- **Kiguwa SL, Hextall P, Smith AL, Critcher R, Swinburne J, Millon L, Binns MM, Goodfellow PN, McCarthy LC, Farr CJ, Oakenfull EA** (2000). A horse whole-

- genome-radiation hybrid panel: chromosome 1 and 10 preliminary maps. *Mammalian Genome* 11(9):803-5.
- **Kimura M** (1983). The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
  - **Kimura M y Ohta T** (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 75(6):2868-72.
  - **Kimura M y Crow JF** (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-738.
  - **Kolodner RD, Marsischky GT** (1999). Eukaryotic DNA mismatch repair. *Current Opinion in Genetics and Development*, 9, 89-96.
  - **Konfortov BA, Licence VE y Miller JR** (1999). Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. *Mammalian Genome* 10, 1142-1145.
  - **Korol AB, Preygel IA, Preygel SI** (1994). Recombination variability and Evolution. Chapman y Hall, London.
  - **Koskinen MT, Bredbacka P** (2000). Assessment of the population structure of five Finnish dog breeds with microsatellites. *Animal Genetics* 31(5):310-7.
  - **Kronacher C** (1937). Elementos de Zootecnia. Gustavo Gili. Barcelona.
  - **Kumar S y Blair Hedges S** (1998). A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* 392:917-920.
  - **Kuz'mina EE** (1994). From where did the Indo-Aryans come Otkuda prishli indoarii. Russian Academy of Sciences, Moscow.
  - **Lai E, Riley J, Purvis I y Roses A** (1998). A 4-Mb high-density single nucleotide polymorphism-based map around human APOE. *Genomics* 54, 31-38.
  - **Laval G, Iannuccelli N, Legault C, Milan D, Groenen MAM, Giuffra E, Andersson L, Nissen PH, Jørgensen CB, Beeckmann P, Geldermann H, Foulley J-L, Chevalet C, Ollivier L** (2000). Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genetics Selection and Evolution* 32:187-203.

- 
- **Lear TL, Brandon R, Piumi F, Terry RR, Guerin G, Thomas S, Bailey E** (2001). Mapping of 31 horse genes in BACs by FISH. *Chromosome Research* 9(3):261-2.
  - **Lebart L, Morineau A, and Tabard N** (1977). Techniques de la description statistique. Paris: Dunod.
  - **Lebart L, Morineau A y Piron M** (1995). Statistique exploratoire multidimensionnelle, Dunod, Paris, p. 56,95-96.
  - **Leung WK, Kim JJ, Kim JG, Graham DY, Sepulveda SR** (2000). Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *American Journal of Pathology*, 156, 537-543.
  - **a Levine MA** (1999). Botai and the origins of horse domestication. *Journal of Anthropological Archaeology* 18: 29-78.
  - **b Levine MA** (1999). The origins of horse husbandry on the Eurasian Steppe. In Levine MA, Rassamakin Y, Kislenko AM, Tatarintseva NS (Eds), *Late Prehistoric Exploitation of the Eurasian Steppe*. McDonald Institute, Cambridge.
  - **Levine MA, Bailey GN, Whitwell KE, Jeffcott LB** (2000) Palaeopathology and horse domestication. In Bailey G, Charles R, Winder N (Eds), *Human Ecodynamics and Environmental Archaeology*. Oxbow, Oxford.
  - **Levinson G, Gutman GA** (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4(3):203-21
  - **Lewontin RC** (1974). The Genetic Basis of Evolutionary Change. Columbia UP.
  - **Li WH, Gojobori T, Nei M** (1981). Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature* 16;292(5820):237-9.
  - **Lindgren G, Breen M, Godard S, Bowling A, Murray J, Scavone M, Skow L, Sandberg K, Guerin G, Binns M, Ellegren H** (2001). Mapping of 13 horse genes by fluorescence in-situ hybridization (FISH) and somatic cell hybrid analysis *Chromosome Research* 9(1):53-9.
  - **Lindgren G, Sandberg K, Persson H, Marklund S, Breen M, Sandgren B, Carlsten J, Ellegren H** (1998). A primary male autosomal linkage map of the horse genome *Genome Research* 8(9):951-66.

- **Lindroos K, Sigurdsson S, Johansson K, Ronnblom L, Syvanen AC** (2002). Multiplex SNP genotyping in pooled DNA samples by a four-colour microarray system. *Nucleic Acids Research* 15;30(14):70
- **Littauer MA, Crouwel JH** (1996). The origin of the true chariot. *Antiquity*: 934-939.
- **Liu L, Dybvig K, Panangala VS, van Santen VL, French CT** (2000). GAA trinucleotide repeat region regulates M9/pMGA gene expression in *Mycoplasma gallisepticum*. *Infection and Immunity* 68, 871-876.
- **Livak KJ** (1999). Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genetic Analysis* 1999 14(5-6):143-9
- **Lougheed SC, Gibbs HL, Prior KA, Weatherhead PJ** (2000). A comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in population studies of the massasauga rattlesnake. *Journal of Heredity* 91(6):458-63.
- **Lowenhaupt K, Rich A, Pardue ML** (1989). Non random distribution of long mono- and dinucleotide repeats in *Drosophila* chromosomes: correlations with dosage compensation, heterochromatin, and recombination. *Molecular and Cellular Biology* 9: 1173-1182.
- **Lowenstein JM, Ryder OA** (1985). Immunological systematics of the extinct quagga (*Equidae*). *Experientia* 41:1192-1193.
- **Lue NL, Buchman AR, Kornberg RD** (1989). Activation of yeast RNA polymerase II transcription by a thymidine-rich upstream element in vitro. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 86, 486-490.
- **Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM, Sherwin WB** (1998). Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89(3):238-47.
- **MacHugh DE, Loftus RT, Cunningham P, Bradley DG** (1998). Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics* 29(5):333-40
- **MacHugh DE, Shriver MD, Loftus RT, Cunningham P, Bradley DG** (1997). Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics*. 46(3):1071-86.

- 
- **Mallory JP** (1989). In Search of the Indo-Europeans. Thames and Hudson, London.
  - **Mansfield ES, Worley JM, McKenzie SE, Surrey S, Rappaport E, Fortina P** (1995). Nucleic acid detection using non-radioactive labelling methods. *Molecular and Cellular Probes* 9(3):145-56.
  - **Mantel N** (1967). The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
  - **Marcotte EM, Pellegrini M, Yeates TO, Eisenberg D** (1999). A census of protein repeats. *Journal of Molecular Biology* 293, 151-160.
  - **Mariat D, Oustry-Vaiman A, Crihiu EP, Raudsepp T, Chowdhary BP, Guerin G** (2001). Isolation, characterization and FISH assignments of horse BAC clones containing type I and II markers. *Cytogenetics and Cell Genetics* 92(1-2):144-8.
  - **Marklund S., Chaudhary R., Marklund L., Sandberg K. y Andersson L** (1995). Extensive mtDNA diversity in horses revealed by PCR-SSCP analysis. *Animal Genetics* 26(3):193-196.
  - **Marklund S., Ellegren H., Eriksson S., Sandberg K. y Andersson L** (1994). Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics* 25, 19-23.
  - **Marra G, Schär P** (1999). Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochemical Journal* 338:1-13.
  - **Marras SAE, Kramer FR, Tyagi S** (2003). Genotyping SNPs with molecular beacons. *Methods in Molecular Biology* 212, 111-28.
  - **Martínez-Arias R, Calafell F, Mateu E, Comas D, Andres A, Bertranpetit J** (2001). Sequence variability of a human pseudogene. *Genome Research* 11(6):1071-85.
  - **Maruyama T y Fuerst PA** (1985). Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics* 111:675-689.
  - **Mason IL** (1960). A World Dictionary of Livestock Breeds Types and Varieties. Agricultural Research Council Unit of Animal Genetics, Institute of Animal Genetics, Edimburgh, Scotland

- **Maudet C, Luikart G, Taberlet P** (2002). Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *Journal of Animal Science* 80:942-950.
- **Meloni R, Albanese V, Ravassard P, Treihou F, Mallet J** (1998). A tetranucleotide polymorphic microsatellite, located in the first intron of the tyrosine hydroxylase gene, acts as a transcription regulatory element in vitro. *Human Molecular Genetics* 7, 423-428.
- **Menotti-Raymond MA, O'Brien SJ** (1995). Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. *Journal of Heredity* 86(4): 319-22.
- **Metzgar D, Bytof J, Wills C** (2000). Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research* 10, 72-80.
- **Meyer R, Hofelein C, Luthy J, Candrian U** (1995). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 78(6):1542-51
- **Miller SA, Dykes DO y Poleskcy HT** (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215.
- **Moazami-Goudarzi K, Laloe D** (2002). Is a multivariate consensus representation of genetic relationships among populations always meaningful?. *Genetics* 162(1):473-84.
- **Modrich P, Lahue R** (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination and cancer biology. *Annual Review of Biochemistry* 65:101-133.
- **Monckton DG, Cayuela ML, Gould FK, Brock GJ, Silva R and Ashizawa T** (1999). Very large (CAG)(n) DNA repeat expansions in the sperm of two spinocerebellar ataxia type 7 males. *Human Molecular Genetics*, 8, 2473-2478.
- **Morera L, Barba CJ, Garrido JJ, Barbancho M, de Andres DF** (1999). Genetic variation detected by microsatellites in five Spanish dog breeds. *Journal of Heredity* 90(6):654-6.
- **Morin PA, Moore JJ, Chakraborty R, Jin L, Goodall J, Woodruff DS** (1994). Kin selection, social structure, gene flow, and the evolution of chimpanzees. *Science* 265:1193-1201.



- 
- **Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-73.
  - **Nadir E, Hargalit H, Gallily T, Ben-Sasson SA** (1996). Microsatellite spreading in the human genome: Evolutionary mechanisms and structural implications. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 93, 6470-6475.
  - **Nei M, Maruyama T, Chakraborty R** (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29, 1-10.
  - **Nei M** (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 70(12):3321-3
  - **Nei M, Chakraborty R, Fuerst PA** (1976). Infinite allele model with varying mutation rate. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 73: 4164-4168.
  - **Nei M** (1972) Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
  - **Nei M, Tajima F y Tatenó Y** (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19:153-170.
  - **Newman D** (1996). Importance of genetics on the survival of small populations: genetic drift, inbreeding and migration (PhD dissertation), Missal, Montana: University of Montana.
  - **O'Brien SJ** (1991). Molecular genome mapping: lessons and prospects. *Current Opinion in Genetics and Development* 1:105-111.
  - **Oakenfull EA y Ryder OA** (1998). Mitochondrial control region and 12S rRNA variation in Przewalski's horse (*Equus przewalskii*). *Animal Genetics* 29, 456-459.
  - **Oliveira C, Barbosa E, Oliveira E, Arranz JJ, Bayón Y, Brito NV, San Primitivo F** (2003). Genetic variability in "Bordaleira de entre Douro e Minho" and "Serra da Estrella" portuguese sheep breeds using microsatellites. *Electrónica Journal of Environmental Agricultural Food Chemistry* 2(4).
  - **Oota H, Settheetham-Ishida W, Tiwawech D, Ishida T, Stoneking M** (2001). Human mtDNA and Y-chromosome variation is correlated with matrilineal versus patrilineal residence. *Nature Genetics* 29(1):20-1.

- **Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T** (1989a). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 2766-2770.
- **Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K** (1989b). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879.
- **Orozco Piñán, F** (1985). Algunas ideas sobre el concepto de raza en animales domésticos. Publicaciones del INIA. Madrid.
- **Ota T** (1993). DISPAN: Genetic Distance and Phylogenetic Analysis. Pennsylvania State University, University Park, USA.
- **Padar Z, Angyal M, Egyed B, Furedi S, Woller J, Zoldag L, Fekete S** (2001). Canine microsatellite polymorphisms as the resolution of an illegal animal death case in a Hungarian zoological gardens. *International Journal of Legal Medicine* 115(2):79-81.
- **Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C** (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4(3):347-54.
- **Pardue ML, Lowenhaupt K, Rich A, Nordheim A** (1987). (dC-dA)<sub>n</sub>.(dG-dT)<sub>n</sub> sequences have evolutionary conserved chromosomal locations in *Drosophila* with implications for roles in chromosome structure and function. *EMBO Journal* 6:1781-1789.
- **Parker JD, Rabinovitch PS, Burner GC** (1991). Targeted gene walking polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* 11;19(11):3055-60.
- **Piggott S** (1992). Wagon, Chariot and Carriage. Thames and Hudson, London.
- **Piry S, Luikart G y Cornuet J-M** (1999). Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90, 502-3.
- **Poetsch M, Seefeldt S, Maschke M, Lignitz E** (2001). Analysis of microsatellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer—possible employment in forensic applications. *Forensic Science International* 1;116(1):1-8.
- **Postgate JN** (1986). The equids of Sumer, again. In Meadow RH, Uerpmann H-P (Eds), *Equids in the Ancient World*. Dr. Ludwig Reichert Verlag, Weisbaden.

- **Primmer CR, Aho T, Piironen J, Estoup A, Cornuet JM, Ranta E** (1999). Microsatellite analysis of hatchery stocks and natural populations of Arctic charr. *Salvelinus alpinus*, from the Nordic region: implications for conservation. *Hereditas* 130, 277-289.
- **Primmer CR, Ellegren H, Saino N, Moller AP** (1996). Directional evolution in germline microsatellite mutations. *Nature Genetics* 13, 391-393.
- **Primmer CR, Koskinen MT, Piironen J** (2000). The one that did not get away: individual assignment using microsatellite data detects a case of fishing competition fraud. *Proceedings of the Royal Society of London. Serie B: Biological Sciences.* 22; 267(1453):1699-704.
- **Primmer CR, Moller AP, Ellegren H** (1996a). New microsatellites from the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca* and the swallow *Hirundo rustica* genomes. *Hereditas* 124(3):281-3.
- **Quinn TW y White BN** (1987). Analysis of DNA sequence variation. 163-198. in F Cooke and PA Buckley, eds. *Avian Genetics*. Academic Press, London.
- **Ralls K, Ballou JD, Templeton A** (1998). Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. *Conservation Biology* 2:185-193.
- **Ranade K, Chang MS, Ting CT, Pei D, Hsiao CF, Olivier M, Pesich R, Hebert J, Chen YD, Dzau VJ, Curb D, Olshen R, Risch N, Cox DR, Botstein D** (2001). High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. *Genome Research* 11(7):1262-8
- **Rannala B, Mountain JL** (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 94(17):9197-201.
- **Raymond M y Rousset F** (1995). GENEPOP Version 1.2, population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-9.
- **Renfrew C** (1987). *Archaeology and Language: the Puzzle of Indo-European Origins*. Jonathan Cape, London.
- **Reed DH, Frankham R** (2001). How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution Int J Org Evolution*. 55(6):1095-103.

- **Rodero E y Herrera M** (2000). El concepto de raza. Un enfoque epistemológico. *Archivos de Zootecnia* 49: 5-16.
- **Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P** (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry* 1;242(1):84-9.
- **Roques S, Duchesne P, Bernatchez L** (1999). Potential of microsatellites for individual assignment: the North Atlantic redfish (genus *Sebastes*) species complex as a case study. *Molecular Ecology* 8(10):1703-17.
- **Royle J, Clarkson RE, Wong Z Y, Jeffreys A** (1988). Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics* 3, 352-360.
- **Rubinsztein DC, Leggo J, and Amos W** (1995). Microsatellites evolve more rapidly in humans than in chimpanzees. *Genomics* 30:610-612.
- **Saha N y Tay JS** (1992). Origins of the Koreans: a population genetic study. *American Journal of Physical Anthropology* 88: 27-36.
- **Saha N, Mak JW, Tay JS, Liu Y, Tan JA** (1995). Population genetic study among the Orange Asli (Semai Senoi) of Malaysia: Malayan aborigines. *Human Biology* 67(1): 37-57.
- **Saiki RK, Scharf S, Faloona F** (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-54.
- **Saitbekova N, Gaillard C, Obexer-Ruff G, Dolf G** (1999). Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Animal Genetics* 30(1):36-41.
- **Saitou N y Nei M** (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.
- **Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T** (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor (N.Y.) Laboratory Press, Vol. 3.
- **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1997). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 74(12):5463-7.
- **Savolainen P, Lundeberg J** (1999). Forensic evidence based on mtDNA from dog and wolf hairs. *Journal of Forensic Science* 44, 77-81.

- 
- **Schlotterer C, Tautz D** (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 25;20(2):211-5
  - **Schug MD, Wetterstrand KA, Gaudette MS, Lim RH, Hutter CM y Aquadro CF** (1998). The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology* 7, 57-70.
  - **Sharma D, Appa Rao KB, Singh RV, Totey SM** (2001). Genetic diversity among chicken breeds estimated through randomly amplified polymorphic DNA. *Animal Biotechnology* 2001 Nov;12(2):111-20
  - **Shiue YL, Bickel LA, Caetano AR, Millon LV, Clark RS, Eggleston ML, Michelmore R, Bailey E, Guerin G, Godard S, Mickelson JR, Valberg SJ, Murray JD, Bowling AT** (1999). A synteny map of the horse genome comprised of 240 microsatellite and RAPD markers. *Animal Genetics* 30(1):1-9.
  - **Shriver MD, Jin L, Chakraborty R, Boerwinkle E** (1993). VNTR allele frequency distributions under the stepwise mutation model: a computer simulation approach. *Genetics* 134(3):983-93.
  - **Shubitowski DM, Venta PJ, Douglass CL, Zhou RX, Ewart SL** (2001). Polymorphism identification within 50 equine gene-specific sequence tagged sites. *Animal Genetics* 32(2):78-88.
  - **a Slatkin M (1995)**. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139(3):1463.
  - **b Slatkin, M (1995)**. Hitchhiking and associative overdominance at a microsatellite locus. *Molecular Biology and Evolution* 12:473-480.
  - **Smith EJ, Jones CP, Bartlett J, Nestor KE** (1996). Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys. *Poultry Science* 75(5):579-84.
  - **Sneath PHA y Sokal RR** (1973). Numerical taxonomy W.H. Freeman, San Francisco.
  - **Southern EM** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503.

- **Stephens JC, Bilbert DA, Yuhki N, y O'Brien SJ** (1992). Estimation of heterozygosity for single-probe multilocus DNA fingerprints. *Molecular Biology and Evolution* 9:729-743.
- **Stone AC, Griffiths RC, Zegura SL y Hammer MF** (2002). High levels of Y-chromosome nucleotide diversity in the genus Pan. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 8;99(1):43-48.
- **Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD** (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365:274-276.
- **Streisinger G, Owen JE** (1985). Mechanisms of spontaneous and induced frameshift mutation in bacteriophage T4. *Genetics* 109:633-659.
- **Sudhir K, Koichiro T, Ingrid BJ y Masatoshi N** (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- **Sundqvist AK, Ellegren H, Olivier M y Vilà C** (2001). Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on microsatellite markers. *Molecular Ecology* 10,1959-1966.
- **Surridge AK, Bell DJ, Ibrahim KM, Hewitt GM** (1999). Population structure and genetic variation of european wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in east anglia. *Heredity*. 82 (Pt 5):479-87.
- **Swinburne J, Gerstenberg C, Breen M, Aldridge V, Lockhart L, Marti E, Antczak D, Eggleston-Stott M, Bailey E, Mickelson J, Roed K, Lindgren G, von Haeringen W, Guerin G, Bjarnason J, Allen T, Binns M** (2000). First comprehensive low-density horse linkage map based on two 3-generation, full-sibling, cross-bred horse reference families. *Genomics* 1;66(2):123-34.
- **Swofford DL y Selander RB** (1989). BIOSYS-1. A Computer Program for the Analysis of Allelic Variaton in Population Genetics and Biochemycal Systematics (Release 1.7). University of Illinois, Urbana, Champaign, USA.
- **Takesaki N, Nei M** (1996). Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite data. *Genetics* 144, 388-399.

- 
- **Tautz D** (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 25;17(16):6463-71.
  - **Taylor EB, Beacham TD y Kaeriyama M** (1994). Population structure and identification of North Pacific Ocean chum salmon (*Oncorhynchus keta*) revealed by an analysis of minisatellite DNA variation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 51:1430-1442.
  - **Telegin DY** (1986). Dereivka, a settlement and cemetery of Copper Age horse keepers on the Middle Dnieper. Vol. 287, BAR International Series.
  - **Templeton AR, Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Boerwinkle E, Sing CF** (2000). Recombinational and mutational hot spots within the human lipoprotein lipase gene. *American Journal of Human Genetics* 66, 69-83.
  - **Thaon d'Arnoldi C, Foulley JL, Ollivier L** (1998). An overview of the Weitzman approach to diversity. *Genetics Selection and Evolution* 30, 149-161.
  - **Tóth G, Gáspári Z, Jurka J** (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10, 967-981.
  - **Turton JD** (1974). The collection storage and dissemination of information on breeds of livestock. *Proceeding 1<sup>st</sup> World Congress on Genetic and Applied Livestock production* Vol II: 61-74. Madrid.
  - **Tyagi S and Kramer FR** (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 14, 303-308.
  - **Underhill PA, Shen P, Lin AA, Jin L, Passarino G, Yang WH, Kauffman E, Bonne-Tamir B, Bertranpetit J, Francalacci P, Ibrahim M, Jenkins T, Kidd JR, Mehdi SQ, Seielstad MT, Wells RS, Piazza A, Davis RW, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ** (2000). Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nature Genetics*. 26(3):358-61
  - **Uphyrkina O, Warren Johnson E, Quigley H, Miquelle D, Marker L, Bush M, O'Brien SJ** (2001). Phylogenetics, genome diversity and origin of modern leopard, *Panthera pardus*. *Molecular Ecology* 10,2617-2633.
  - **Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB** (1993). Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* 133(3):737-49.

- **Van Haeringen H, Bowling AT , Stott ML, Lenstra JA y Zwaagstra KA (1994).** A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. *Animal Genetics* 25, 207.
- **Vankan DM, Faddy MJ (1999).** Estimations of the efficacy and reliability of paternity assignments from DNA microsatellite analysis of multiple- matings sire *Animal Genetics* 30(5):355-6.
- **Vila C, Leonard JA, Gottherstrom A, Marklund S, Sandberg K, Liden K, Wayne RK, Ellegren H (2001).** Widespread origins of domestic horse lineages. *Science* 19;291(5503):474-7.
- **Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes , Fritjers A, Pot J, Pelman J, Kuiper M y Zabeau M (1995).** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- **Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lander ES, y col. (1998).** Large-scale identification, mapping and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280, 1077-1082.
- **Wang W, Liu AH, Lin SY, Lan H, Su B, Xie DW y Shi LM (1994).** Multiple genotypes of mitochondrial DNA within a horse population from a small region in Yunnan Province of China. *Biochemical Genetics* 32(9-10):371-378.
- **Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD (1994).** Survey of plant short tandem repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 88, 1-6.
- **Ward TJ, Skow LC, Gallagher DS, Schnabel RD, Nall CA, Kolenda CE, Davis SK, Taylor JF y Derr JN (2001).** Differential introgression of uniparentally inherited markers in bison populations with hybrid ancestries. *Animal Genetics* Volume 32 Issue 2 Page 89.
- **Waser P y Strobeck C (1998).** Genetic signatures of interpopulation dispersal. *Trends in Ecology & Evolution* 13:43-44.
- **Wasson J, Skolnick G, Love-Gregory L, Permutt MA (2002).** Assessing allele frequencies of single nucleotide polymorphisms in DNA pools by pyrosequencing technology. *Biotechniques* 32(5):1144-6, 1148, 1150



- 
- **Watterson GA** (1984). Allele frequencies after a bottleneck. *Theoretical Population Biology* 26:387-407.
  - **Weber JL, Wong C** (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2(8):1123-8
  - **Wei R, Dentine MR, Bitgood JJ** (1997). Random amplified polymorphic DNA markers in crosses between inbred lines of Rhode Island Red and White Leghorn chickens. *Animal Genetics* 28(4):291-4
  - **Weir BS y Cockerham CC** (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
  - **Weir BS** (1990). Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland Massachusetts, 377p.
  - **Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M** (1992). A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 359(6398):794-801.
  - **Weitzman M** (1992). On diversity. *Quarterly Journal of Economics* 107, 363-405.
  - **Weitzman M** (1993). What to preserve? An application of diversity theory to crane conservation. *Quarterly Journal of Economics* 108, 157-183.
  - **Welsh J, McClelland M** (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18(24):7213-8.
  - **Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 25;18(22):6531-5.
  - **Wimmers K, Ponsuksili S, Hardge T, Valle-Zarate A, Mathur PK, Horst P** (2000). Genetic distinctness of African, Asian and South American local chickens. *Animal Genetics* 31(3):159-65.
  - **Winter E, Varshavsky A** (1989). A DNA binding protein that recognizes oligo(dA)-oligo(dt) tracts. *EMBO Journal* 8, 1867-1877.
  - **Workman PL, Niswander JD** (1970). Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics* 22(1):24-49

- **Wren JD, Forgacs E, Fondon JW 3rd, Pertsemlidis A, Cheng SY, Gallardo T, Williams RS, Shohet RV, Minna JD, Garner HR** (2000). Repeat polymorphisms within gene regions: Phenotypic and evolutionary implications. *Amerian Journal of Human Genetics*, 67, 345-356.
- **Wright S** (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19, 395-420.
- **Wright S** (1969-1978). Evolution and the genetics of populations. 4 Vols. University of Chicago Press., Chicago.
- **Xu X y Snason U** (1994). The complete mitochondrial DNA sequence of the horse. *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene* 148, 357-362.
- **Xu X, Gulberg A y Arnason U** (1996). The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparisons among four closely related mammalian species-pairs. *Journal of Molecular Evolution* 43, 438-446.
- **Yang L, Zhao SH, Li K, Peng ZZ, Montgomery GW** (1999). Determination of genetic relationships among five indigenous Chinese goat breeds with six microsatellite markers. *Animal Genetics* 30:452-455.
- **Young ET, Sloan JS, van Riper K** (2000). Trinucleotide repeats are clustered in regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 164, 1053-1068.
- **Zajc I, Mellersh C, Kelly EP, Sampson J** (1994). A new method of paternity testing for dogs, based on microsatellite sequences. *Veterinary Records* 3;135(23):545-7
- **Zarins J** (1986). Equids associated with human burials in third millennium BC Mesopotamia: two complementary facets. In Meadow RH, Uerpmann H-P (Eds), *Equids in the Ancient World*. Dr. Ludwig Reichert Verlag, Weisbaden.
- **Zhivotovsky LA, Feldman MW, Grishechkin SA** (1997). Biased mutation and microsatellite variation. *Molecular Biology and Evolution* 14, 926-933.

## **IX. ANEXOS**

**Anexo 1:** Frecuencias alélicas del microsatélite HTG4 para cada raza estudiada.

<u>HTG4</u>	AST	JN	LOS	CG	PT	THB	ME	MA
129	0,23	0,02	0,33	0,12	0,15	0,50	0,15	0,10
131	0,10	0,30	0,05	0,12	0,27	0,01	0,29	0,13
133	0,46	0,49	0,46	0,54	0,50	0,42	0,36	0,33
135	0,09	0,02	0,05	---	0,05	0,04	0,07	0,25
137	---	0,08	0,05	0,05	0,02	---	0,13	0,10
139	0,12	0,10	0,05	0,13	0,02	0,03	0,02	0,10
141	---	---	---	0,04	---	---	---	---

**Anexo 2:** Frecuencias alélicas del microsatélite HTG6 para cada raza estudiada.

<u>HTG6</u>	AST	JN	LOS	CG	PT	THB	ME	MA
84	0,02	0,21	0,03	0,04	0,11	0,27	0,10	0,15
88	0,05	0,03	0,02	0,04	0,01	---	0,05	0,08
90	0,17	0,03	0,27	0,17	0,20	0,52	0,23	0,43
92	---	---	0,01	---	---	---	---	---
96	0,01	0,02	---	0,07	0,02	0,01	---	---
98	---	---	---	0,04	---	---	---	0,05
100	0,65	0,71	0,57	0,55	0,52	0,18	0,55	0,18
102	0,09	---	0,11	0,08	0,15	---	0,08	0,13
104	0,01	---	---	0,01	---	---	---	---
106	---	---	---	0,01	---	0,03	---	---

**Anexo 3:** Frecuencias alélicas del microsatélite HTG7 para cada raza estudiada.

<u>HTG7</u>	AST	JN	LOS	CG	PT	THB	ME	MA
118	0,51	0,19	0,18	0,22	0,17	0,18	0,16	0,23
120	---	0,01	---	---	---	---	---	---
122	0,01	0,11	0,06	0,08	0,18	0,01	0,02	0,45
124	0,22	0,34	0,32	0,14	0,14	0,38	0,10	---
126	0,25	0,35	0,44	0,53	0,52	0,44	0,73	0,33
128	---	---	---	0,03	---	---	---	---

**Anexo 4:** Frecuencias alélicas del microsatélite HTG8 para cada raza estudiada.

HTG8	AST	JN	LOS	CG	PT	THB	ME	MA
176	0,48	0,44	0,46	0,32	0,43	0,01	0,15	0,35
178	---	0,02	---	---	---	0,01	---	---
180	0,03	0,14	0,20	0,27	0,18	0,14	0,24	0,10
182	0,03	0,09	---	0,03	0,02	---	---	0,03
184	---	0,01	---	0,01	---	---	---	---
186	0,18	0,23	0,27	0,28	0,25	0,65	0,24	0,33
188	0,22	0,04	0,05	0,09	0,11	0,19	0,29	0,18
190	---	---	0,01	---	---	---	0,08	0,03
192	0,06	0,04	0,02	---	0,02	---	---	---

**Anexo 5:** Frecuencias alélicas del microsatélite HTG10 para cada raza estudiada.

HTG10	AST	JN	LOS	CG	PT	THB	ME	MA
94	---	0,02	---	0,01	---	0,31	0,13	---
96	---	---	---	0,01	---	0,01	---	---
98	0,03	0,05	0,02	0,04	0,03	0,13	0,08	0,08
100	0,24	0,03	0,14	0,04	0,09	0,13	0,05	0,15
102	0,27	0,14	0,02	0,12	0,13	0,18	0,10	0,25
104	0,15	0,05	0,08	0,08	0,14	---	---	0,08
106	0,08	0,48	0,24	0,33	0,29	0,16	0,45	0,20
108	0,02	0,04	0,10	0,13	0,06	---	---	0,03
110	---	0,08	0,01	0,06	0,10	---	0,03	0,03
112	0,21	0,10	0,39	0,20	0,14	0,09	0,08	0,15
114	---	---	---	---	0,03	---	0,08	0,05

**Anexo 6:** Frecuencias alélicas del microsatélite HMS2 para cada raza estudiada.

HMS2	AST	JN	LOS	CG	PT	THB	ME	MA
216	---	---	---	---	---	0,03	---	---
218	0,15	0,17	0,31	0,23	0,29	---	0,31	0,45
220	0,08	0,21	0,13	0,16	0,17	0,12	---	0,05
222	0,18	0,02	---	0,03	0,06	0,16	---	---
224	0,21	0,23	0,10	0,29	0,09	0,69	0,42	0,18
226	0,04	0,16	0,07	0,13	0,22	---	0,21	0,28
228	---	---	0,08	0,04	0,06	---	---	---
230	---	---	---	---	---	---	---	0,05
232	---	---	---	0,03	---	---	---	---
234	0,08	0,03	0,01	---	---	---	---	---
236	---	0,01	---	---	---	---	---	---
238	0,26	0,19	0,31	0,10	0,12	---	0,07	---

**Anexo 7:** Frecuencias alélicas del microsatélite HMS3 para cada raza estudiada.

HMS3	AST	JN	LOS	CG	PT	THB	ME	MA
150	0,02	0,01	0,16	0,08	0,16	0,50	0,11	0,15
152	---	---	---	0,01	---	---	---	---
158	0,09	0,03	0,05	0,11	0,08	0,10	0,47	0,23
160	0,08	0,01	0,02	0,06	0,08	0,06	---	0,03
162	0,10	0,08	0,05	0,16	0,14	0,09	0,11	0,15
164	0,35	0,64	0,72	0,34	0,30	0,24	0,18	0,23
166	0,29	0,11	0,01	0,17	0,14	---	0,13	0,18
168	0,08	0,10	---	0,07	0,07	0,01	---	0,03
170	---	0,02	0,01	---	0,04	---	---	0,03
172	---	0,01	---	---	---	---	---	---

**Anexo 8:** Frecuencias alélicas del microsatélite HMS6 para cada raza estudiada.

<u>HMS6</u>	AST	JN	LOS	CG	PT	THB	ME	MA
159	0,01	0,01	0,03	0,01	---	---	---	---
161	0,11	0,33	0,11	0,18	0,04	0,08	0,03	---
163	0,16	0,04	0,03	0,26	0,17	0,05	0,07	---
165	0,03	0,07	0,02	0,04	0,21	0,40	0,08	0,40
167	0,19	0,17	0,17	0,06	0,07	---	---	---
169	0,51	0,37	0,65	0,45	0,22	0,02	0,24	0,25
171	---	0,01	---	---	0,30	0,45	0,57	0,35
173	---	---	---	---	---	---	0,02	---

**Anexo 9:** Frecuencias alélicas del microsatélite HMS7 para cada raza estudiada.

<u>HMS7</u>	AST	JN	LOS	CG	PT	THB	ME	MA
170	---	---	---	0,04	---	---	---	---
172	0,10	0,01	0,04	0,04	0,02	0,14	0,02	0,03
174	0,02	0,13	0,21	0,21	0,05	---	0,27	0,15
176	0,36	0,26	0,08	0,20	0,43	0,21	0,34	0,28
178	0,35	0,15	0,23	0,12	0,17	0,13	0,02	0,08
180	0,04	0,28	0,33	0,16	0,18	0,23	0,21	0,13
182	0,13	0,16	0,12	0,21	0,13	0,29	0,13	0,20
184	---	0,01	---	0,02	0,03	---	---	0,15
186	---	0,01	---	0,01	---	---	0,02	---

**Anexo 10:** Frecuencias alélicas del microsatélite ASB2 para cada raza estudiada.

<u>ASB2</u>	AST	JN	LOS	CG	PT	THB	ME	MA
154	0,03	---	---	---	---	0,05	---	---
170	0,01	0,15	0,05	0,04	0,05	---	0,03	0,08
172	0,14	---	0,05	---	0,02	---	---	---
174	0,23	0,13	0,08	0,08	0,11	0,14	0,05	---
176	---	---	0,08	0,02	0,09	---	0,10	0,10
178	0,25	0,19	0,21	0,35	0,24	0,13	0,26	0,53
180	0,12	0,25	0,08	0,23	0,29	0,18	0,32	0,15
182	---	0,03	0,04	0,13	0,13	0,12	0,05	0,03
184	---	0,01	0,06	0,01	---	0,03	0,03	0,13
186	0,20	0,21	0,27	0,12	0,04	0,15	0,15	---
188	---	0,04	0,08	0,02	0,04	0,21	0,02	---

**Anexo 11:** Frecuencias alélicas del microsatélite AHT4 para cada raza estudiada.

<u>AHT4</u>	AST	JN	LOS	CG	PT	THB	ME	MA
148	0,33	0,27	0,19	0,26	0,27	0,20	0,32	0,13
150	---	0,01	0,27	0,12	0,09	---	0,10	0,08
152	0,05	0,17	0,02	0,08	0,11	0,22	0,18	0,18
154	0,24	0,09	0,20	0,15	0,24	0,15	0,18	0,28
156	0,10	0,02	---	0,02	0,01	---	0,05	0,05
158	0,04	---	0,02	0,05	---	---	0,03	---
160	---	0,05	0,14	0,04	0,03	---	0,03	0,03
162	0,14	0,26	0,17	0,24	0,27	0,43	0,11	0,18



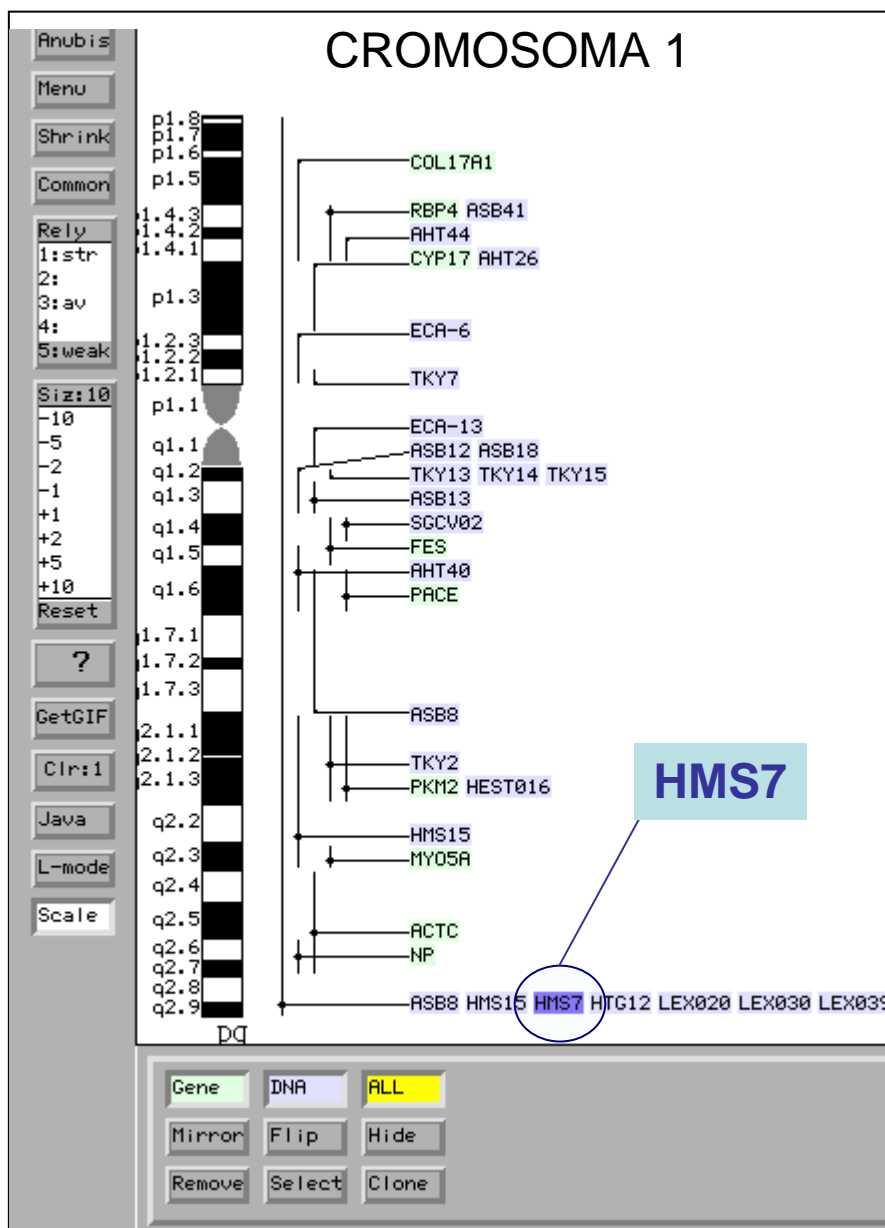
**Anexo 12:** Frecuencias alélicas del microsatélite AHT5 para cada raza estudiada.

<u>AHT5</u>	AST	JN	LOS	CG	PT	THB	ME	MA
128	---	---	---	0,01	---	---	---	---
130	---	0,01	---	---	---	---	---	---
132	0,16	0,27	0,23	0,12	0,26	0,18	0,18	---
134	0,31	0,11	0,06	0,13	0,21	0,40	0,00	0,25
136	---	0,18	0,02	0,08	0,05	---	0,15	0,13
138	0,12	0,13	0,26	0,12	0,13	0,24	0,19	0,03
140	0,40	0,22	0,24	0,48	0,18	0,12	0,36	0,55
142	0,01	0,07	0,20	0,07	0,19	0,06	0,13	0,05

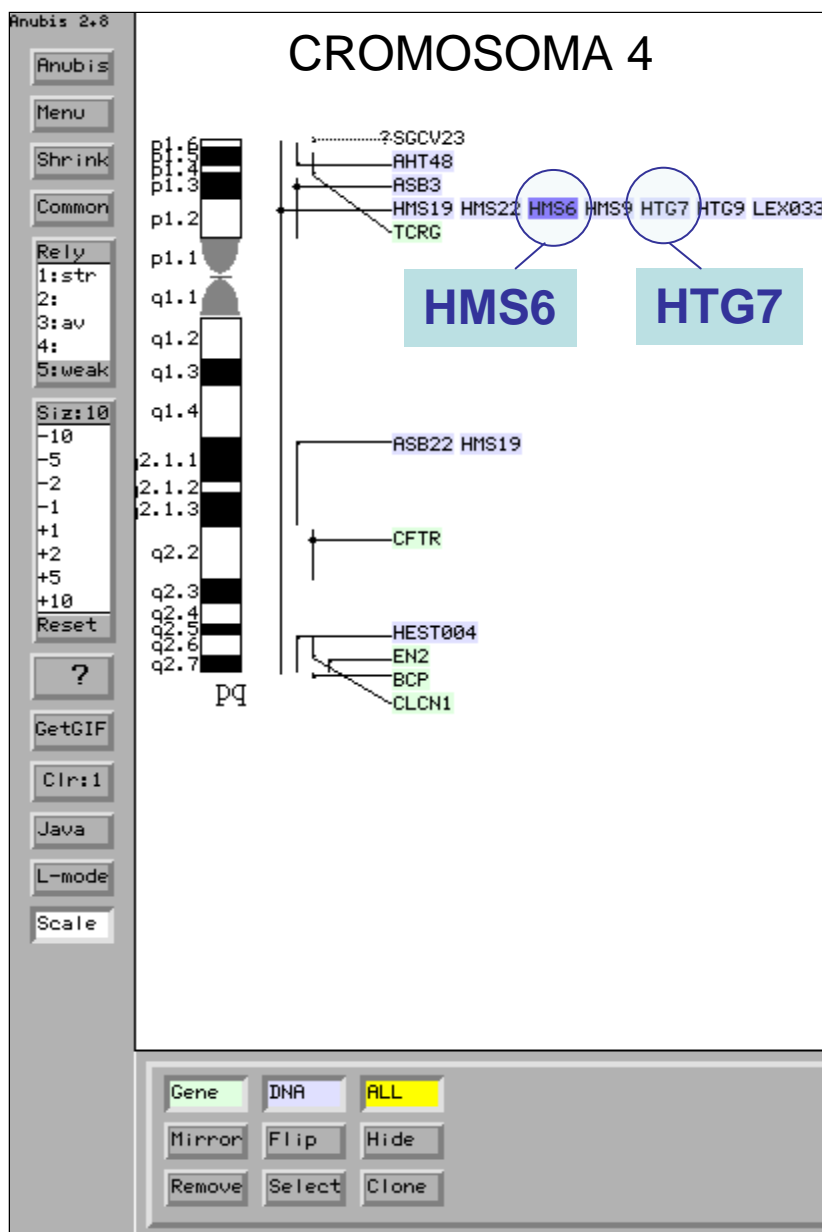
**Anexo 13:** Frecuencias alélicas del microsatélite VHL20 para cada raza estudiada.

<u>VHL20</u>	AST	JN	LOS	CG	PT	THB	ME	MA
87	0,22	0,11	0,44	0,21	0,27	0,21	0,18	0,05
89	---	0,03	---	0,03	0,04	---	---	---
91	---	0,01	0,05	---	0,03	---	---	---
93	0,09	0,05	0,05	0,06	0,05	0,17	0,23	0,10
95	0,05	0,26	0,10	0,11	0,24	0,40	0,23	0,55
97	0,12	0,16	0,02	0,13	0,14	0,23	0,07	0,03
99	0,07	0,13	0,12	0,17	0,06	---	0,08	---
101	0,31	0,16	0,17	0,19	0,06	---	0,08	0,08
103	0,04	0,07	0,05	0,04	0,06	---	0,10	0,15
105	0,11	0,02	0,01	0,06	0,07	---	0,05	0,05

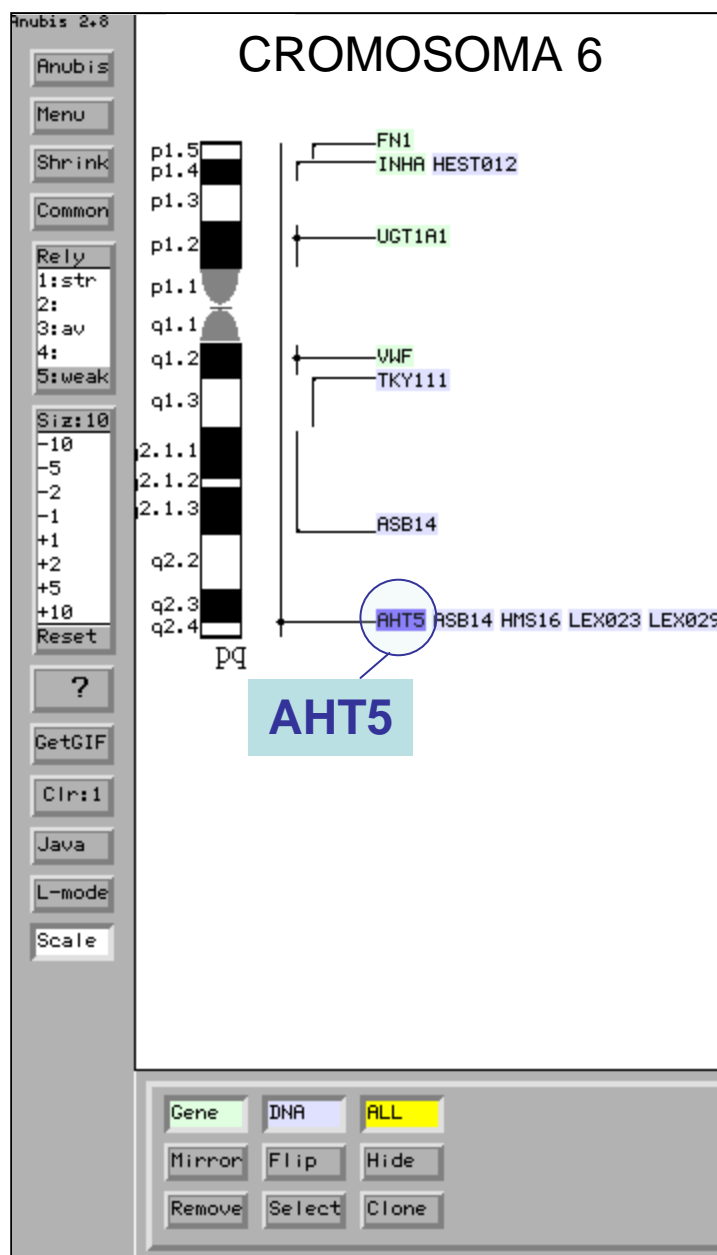
**Anexo 14:** Zona del cromosoma 1 donde se encuentra localizado el microsatélite HMS7.



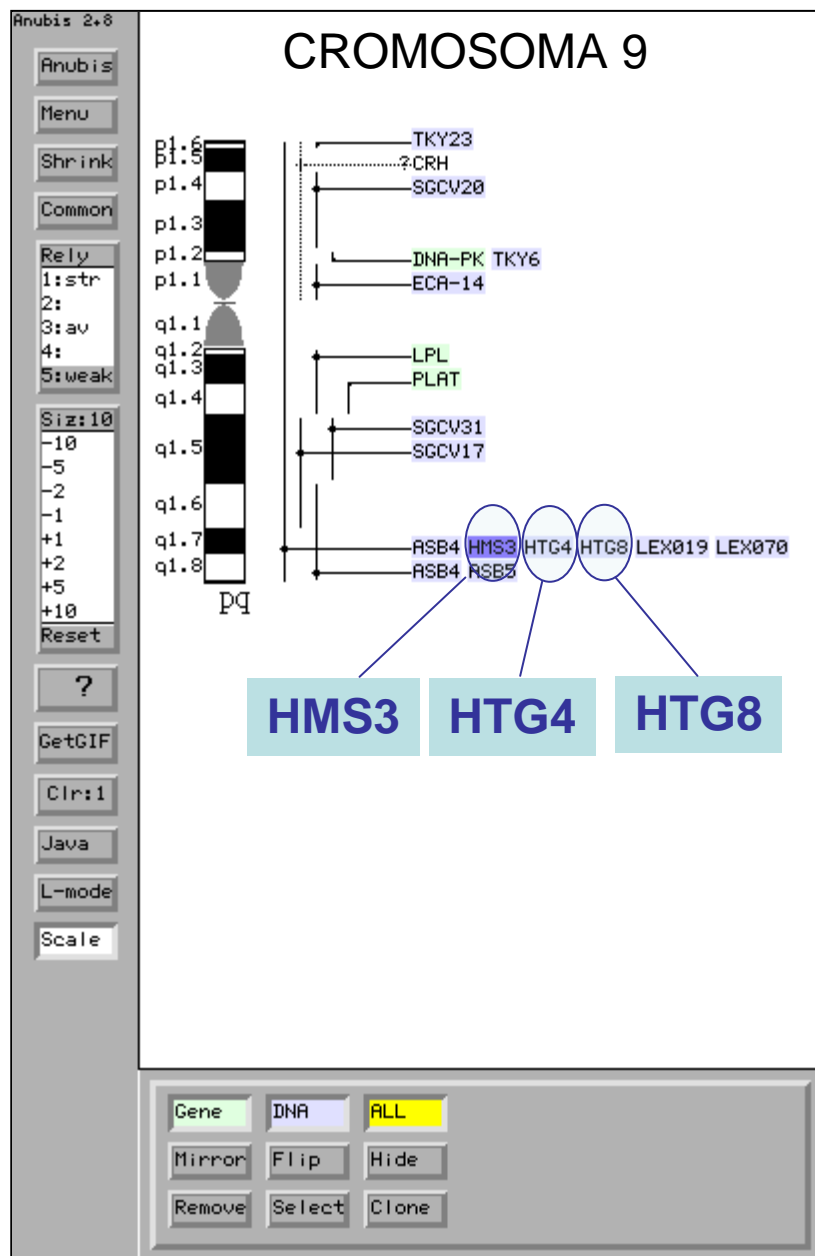
**Anexo 15:** Zona del cromosoma 4 donde se encuentran localizados los microsatélites HMS6 y HTG7.



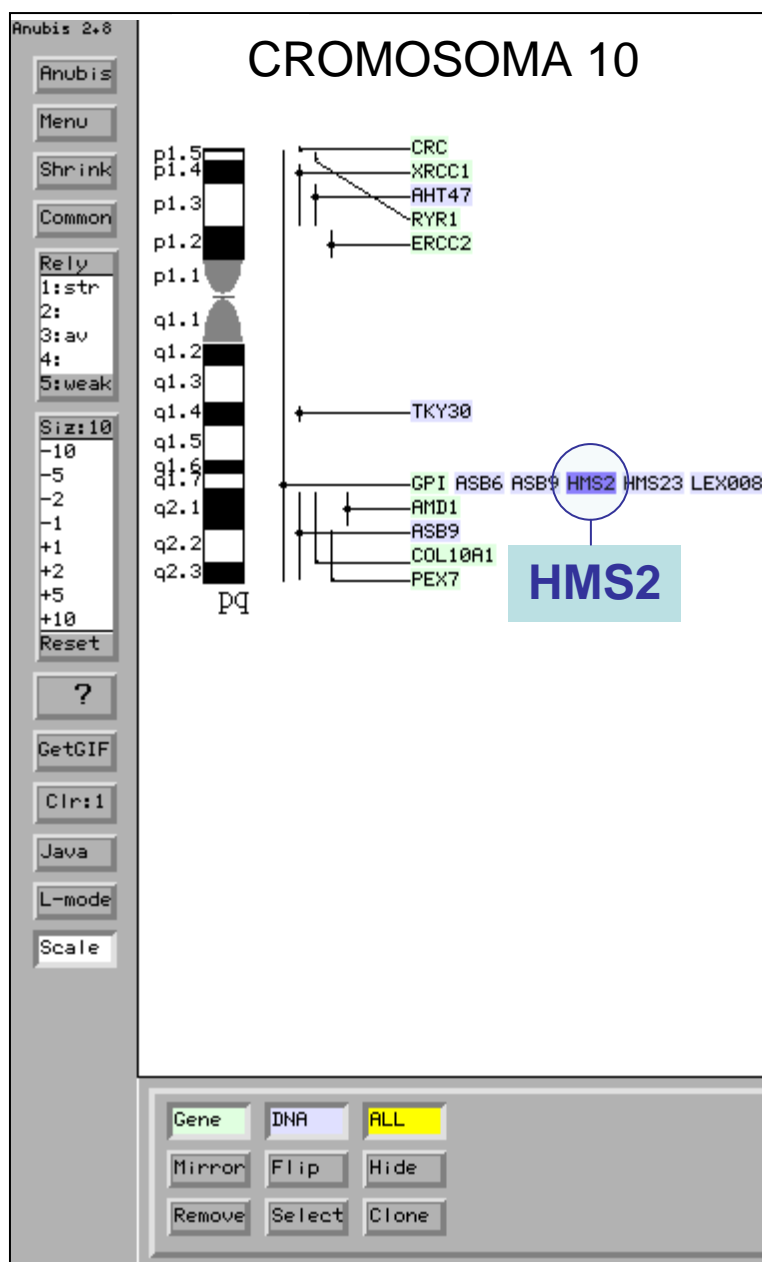
**Anexo 16:** Zona del cromosoma 6 donde se encuentra localizado el microsatélite AHT5.



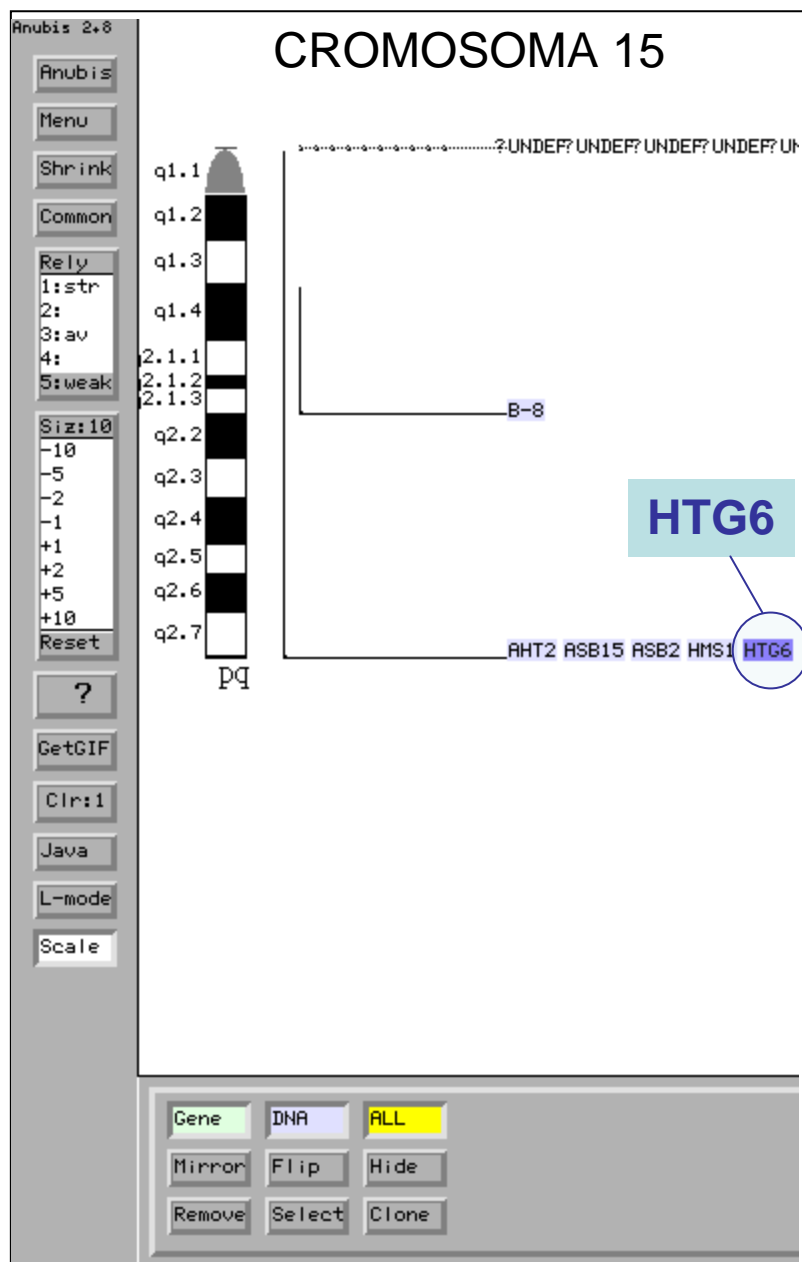
**Anexo 17:** Zona del cromosoma 9 donde se encuentran localizados los microsatélites HMS3, HTG4 y HTG8.



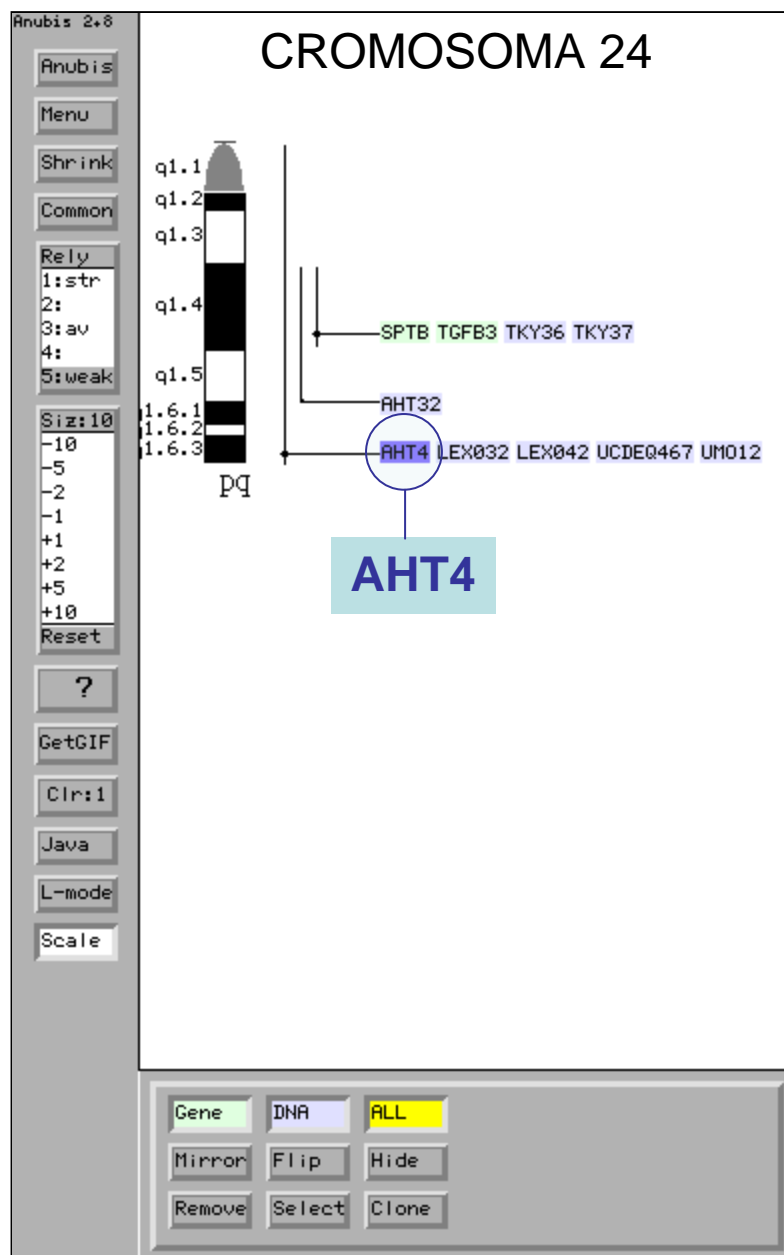
**Anexo 18:** Zona del cromosoma 10 donde se encuentra localizado el microsatélite HMS2.



**Anexo 19:** Zona del cromosoma 15 donde se encuentra localizado el microsatélite HTG6.



**Anexo 20:** Zona del cromosoma 24 donde se encuentra localizado el microsatélite AHT4.





**Anexo 21:** Zona del cromosoma 15 donde se encuentra localizado el microsatélite VHL20.

